

A hízósejtek és a bazofil granulociták génexpressziós tulajdonságainak vizsgálata

Doktori értekezés

Baráné Gilicze Anna

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Berki Tímea, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Erdélyi Dániel, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ferdinandy Péter, Ph.D., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tud. főmunkatárs
Dr. Szeberényi Szabolcs, Ph.D., tud.oszt.vez.
főorvos

Budapest
2015

TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1	A hízósejtek.....	12
2.1.1	A hízósejtek sejtfelszíni expressziója	13
2.1.2	A hízósejtek által termelt, illetve kibocsátott molekulák	16
2.2	A bazofilok.....	22
2.2.1	A bazofilok sejtfelszíni expressziója	23
2.2.2	A bazofilok által termelt, illetve kibocsátott molekulák	25
2.3	MikroRNS-ek	33
2.3.1	A miR-223	34
2.3.2	miR-155	39
2.3.3	miR-16	40
3	CÉLKITŰZÉSEK	41
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	43
4.1	Csontvelői őssejtek izolálása és hízósejtté való differenciáltatása.....	43
4.2	Köldökvér eredetű hízósejtek izolálása.....	44
4.3	A peritoneális hízósejtek izolálása	44
4.4	Toluidinkék és alciánkék-safranin festés	44
4.5	Hízósejtek vizsgálata áramlási citometriával	45
4.6	RNS-izolálás, minőségellenőrzés és real-time PCR.....	45
4.7	Microarray és IPA	45
4.8	Western-blot analízis.....	46
4.9	ELISA assay-k	46
4.10	Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálat	47
4.11	Statisztikai elemzés	47
4.12	Humán vérminták.....	47
4.13	Bazofilok perifériás vérből való immunomágneses szeparálása és IL-3-mal való <i>in vitro</i> stimulációja.....	48
4.14	A humán bazofil sejtek festése May-Grünwald festékkel.....	48
4.15	A humán bazofil granulociták mikroRNS-einek izolációja és detektálása	48
4.16	A miRNS-ekre vonatkozó target predikció és útvonal-elemzés.....	49

5	EREDMÉNYEK	50
5.1	A csontvelői CD117 ⁺ sejtek mukozális hízósejteké történő differenciáltatása	50
5.2	A mukozális hízósejtek érése során különbözőképpen expresszáldó proteáz és proteáz-inhibitor gének kiválasztása	53
5.3	A HtrA1 (Prss11) az érett mukozális hízósejtekre nézve specifikusnak bizonyult	53
5.4	Humán triptáz-típusú hízósejtek is expresszálják a HtrA1-et	56
5.5	A HtrA1 konstitutíven szabadul fel humán hízósejtekből.....	56
5.6	A HtrA1 nem befolyásolja a TGFβ általi egér mukozális hízósejt differenciálódást..	57
5.7	Az izolált bazofilok tisztasága.....	58
5.8	Az IL-3-kezelés hatása a bazofil sejtenyészetekre	59
5.9	miRNS-expresszió humán bazofilokban	60
5.10	A hIL-3 hatása a bazofilok miRNS expressziójára	61
5.11	A detektált miRNS-ek target predikciós és útvonal-analízissel kapott eredményei....	62
6	AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	63
6.1	A mukozális hízósejtek újonnan kimutatott és specifikus szerin-proteáza a HtrA1 ...	63
6.2	A mieloid sejtek mikroRNS expressziója	67
7	KÖVETKEZTETÉSEK	74
8	ÖSSZEFOGLALÁS.....	75
9	SUMMARY	76
10	IRODALOMJEGYZÉK.....	77
11	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	104
12	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	105
13	ÁBRÁK JEGYZÉKE.....	106
14	TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	107

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4-1BB	type 2 transmembrane glycoprotein 4-1BB
ABL2	Abelson tyrosine-protein kinase 2
AML	acute myeloid leukaemia
AN2/PAX6	Aniridia type II protein /paired box gene 6
ANOVA	analysis of variance
APC	allophycocyanin
Arid4b	AT rich interactive domain 4B
B7	peripheral membrane protein B7
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMMC	bone-marrow mast cells
Bmp4	Bone morphogenetic protein 4
C/EBP α	CCAAT enhancer binding protein α
C3a	complement component 3a
C5a	complement component 5a
C5aR	complement component 5a receptor
Caprin-1	Cell cycle-associated protein 1
CCL-1- 6,9,15,19,22,23	C-C chemokine ligand-1-6,9,15,19,22,23
CCR1-5,7	C-C chemokine receptor type 1-5,7
CD30L	CD30 ligand
CD40L	CD40 ligand
cDNS	copyDNS
CLPs	common lymphoid progenitors
CML	chronic myeloid leukaemia
CMPs	common myeloid progenitors
cPLA2	calcium-dependent phospholipase A2
CR1,2,3	complement receptor 1,2,3

CRTH2	chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells
CTAP-III	connective tissue-activating peptide III
CX3CR1	C-X-3 chemokine receptor type 1
CXCL8,12	C-X-C chemokine ligand-8,12
CXCR1-4	C-X-C chemokine receptor type 1-4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E2F1	E2F transcription factor 1
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-like immunosorbent assay
ERA	early rheumatoid arthritis
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
FITC	fluorescein isothiocyanate
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FPRL1-2	formyl peptide receptor-like 1-2
FSC	forward scatter
GATA-1	GATA binding protein 1
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMPs	granulocyte/monocyte progenitors
GPCR	G protein-coupled receptor
H ₁₋₄ R	histamine receptor 1-4
HB-EGF	Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen DR-1
HMC-1	human mast cell line-1
HtrA1	high temperature requirement A serine peptidase 1
HUSI-II	human seminal acrosin inhibitor
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN γ	interferon- γ

IgD,E,G	immunoglobulin D,E,G
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
PI3	phosphatidylinositol-3-kinases
IKK- α	ikappaB kinase complex
IL-1-10,13,16-18,33	interleukin-1-10,13,25,31,33
IL-4,7,16,18,33R	interleukin-4,7,16,18,33 receptor
IPA	ingenuity pathway analysis
JAK-STAT	Janus Kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription
KO	knock-out
KU812	human leukemia cell line KU812
LAIR1	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1
LFA-3	lymphocyte function-associated antigen 3
LIR-3,7	leukocyte immunoglobulin-like receptor 3,7
Lpin2	lipin-2
LPS	lipopolysaccharide
LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein 1
LTB ₄	leukotriene B4
LTC ₄	leukotriene C4
LTD ₄	leukotriene D4
MC-CPA	mast cell carboxypeptidase A
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
Mcpt-1-2,4-7	mast cell chymase-1-2,4-7
MC _T	tryptase mast cells
MC _{TC}	tryptase-chymase mast cells
MDC	macrophage-derived cytokines
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
Mef2c	Myocyte-specific enhancer factor 2C

MEPs	megakaryocyte/erythrocyte progenitors
MHC	major histocompatibility complex
MIP-1 α ,1 β	macrophage inflammatory protein-1 α ,1 β
MIP-2,5	macrophage inflammatory protein-2,5
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
mMCP-11	mouse mast cell protease 11
MMP	matrix metalloproteinase
MMP-1-2,9	matrix metalloproteinase-1-2,9
MMP-9	matrix metalloproteinase-9
MMPs	multipotent progenitors
MPD	myeloproliferative disorders
mRNS	messenger RNS
MuLV	murine leukemia virus reverse transcriptase
NaF	sodium-fluoride
NFI-A	nuclear factor 1 A
NF κ B	nuclear factor κ B
NGF	nerve growth factor
NK-sejtek	natural killer cells
NRP1,2	neuropilin-1,2
OX40L	OX40 ligand
PAF	platelet-activating factor
PAR-2	proteinase activated receptor-2
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PD-L1	programmed death ligand 1
PE	phycoerythrin
PFA	paraformaldehyde
PGD2	prostaglandin D2
PMA	para-methoxyamphetamine
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
pro_MMP-9	matrix metalloproteinase

proIL-18	pro-interleukin-18
pro-MMP-3	matrix metalloproteinase/pro-stromelysin
Prss11	Protease, Serine, 11
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RA	rheumatoid arthritis
RANTES	(CCL5)
RBL-2H3	Rat Basophilic Leukemia (cell type)
RIN	RNS Integrity Number
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
S1P	sphingosine-1-phosphate
SCF	stem cell factor
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
Spink2	serine protease inhibitors of the Kazal type
SSC	side scatter
ST2	growth stimulation expressed gene 2
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TACI	transmembrane activator and CAML (calcium-modulating cyclophilin ligand) interactor
TGFβ	tumor growth factor-β
Tie1	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
TIM-3	T cell immunoglobulin mucin-3
TLR	toll-like receptors
TLR4	toll-like receptor 4
TMB	tetramethylbenzidine
TNFα	tumor necrosis factor α
Tpsg1	Tryptase gamma 1

TRAIL-1,2	TNF α -related apoptosis-inducing ligand-1,2
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
VCAM-1	vascular cell adhesion protein 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A természetes immunitás képviseli az elsődleges védvonalat a patogének elleni immunválaszban, melynek sejtes elemei döntően a mieloid sejtvonalak immunsejtjeiből állnak: ezek a monociták és a makrofágok, a hízósejtek, a neutrofil-, az eozinofil-, a bazofil granulociták, és a mieloid dendritikus sejtek. Ezen sejtek képesek fagocitózissal a behatoló patogén gyors eltávolítására, valamint kemokin-receptoraik segítségével odagyűlnék a fertőzés helyének megfelelő szövetekbe, ahol kiváltják a gyulladásos folyamatokra jellemző komplex fiziológiás hatásokat, – többek közt - a vazodilatáció és a vaszkuláris permeabilitás fokozódását. A mieloid sejtek fejlődésének rendellenességei az érett mieloid sejtek vagy a mieloid blasztok abnormális felszaporodását okozhatják, ezzel akut vagy krónikus mieloid leukémiát okozva.

A mieloid sejtsoporthoz tartozó, az allergiás reakciók fő effekteiseiként ismert hízósejteket és bazofil granulocitákat egyaránt Paul Erlich fedezte fel a XIX. század végén. Számos közös funkcionális és morfológiai tulajdonságuk következtében sokáig ugyanazon sejttypus keringésben levő, illetve szövetekben lokalizálódó sejtformáiként tartották őket számon.

A hízósejtek egy-, esetenként két- vagy sok, nem lebenyezett magvú, kerek vagy hosszúkas sejtek. Intracelluláris granulumaik anilin-kék festékekkel lilára színeződnek. Ezt a festődést a granulumok erősen savas heparin-tartalma okozza. Az érett hízósejtek proliferációra képesek és hosszú hónapokig életben maradnak.[1] A bazofil granulociták a perifériás vér leukocitáinak meglehetősen kis részét, kevesebb, mint 1%-át alkotják; éretten proliferációra képtelenek és életidejük rövid: mindössze kb. 60 óra.[2] Tipikus felépítésük szerint magjuk lebenyezett, bázikus festékekkel festődő citoplazmatikus granulumaik kerek vagy ovális alakúak. Mivel a bazofilek a hízósejtekhez nagyon hasonlóan, metakromáziásan festődnek, elkülönítésükkor segítségünkre lehet a granulumok azon tulajdonsága, hogy azok - bazofilek esetén - a festődést követően eltakarhatják a sejtmagot.

Hasonlóan a monocitákhoz, az eozinofil- és a neutrofil granulocitákhoz, a bazofil granulociták és a hízósejtek is a köldökvérből, a perifériás vérből vagy a csontvelőből

származó CD34⁺ progenitorokból differenciáltathatók. Megjegyzendő, hogy a granulocitáktól eltérően, a hízósejtek érése a periférián megy végbe.

A szervezetben a csontvelői eredetű hematopoietikus őssejtekből fejlődnek a multipotens progenitorok (MMP), majd ezekből jönnek létre a közös mieloid- (CMP) és limfoid progenitorok (CLP). Klasszikusan, a CMP-kből jönnek létre a megakariocita/eritrocita progenitorok (MEP) és a granulocita/monocita progenitorok (GMP). Az, hogy a hízósejtek melyik progenitorból származnak, még vitatott, mint ahogy az is, hogy a bazofilok a hízósejtekkel állnak-e közelebbi rokonságban, vagy az eozinofilokkal.[3]

A hízósejtek és a bazofilok közös progenitorból való származását támasztja alá például, hogy a 97A6 (CD203c családba tartozó antigén) az érett emberi hízósejtekre és bazofilokra specifikus, és semmilyen más hematopoietikus sejtvonalon nem található meg.[4] Egér lépben olyan bipotens, bazofil/hízósejt progenitorokat azonosítottak, amelyekből mind a bazofilok, mind a mukozális- és kötőszöveti hízósejtek létrejötte lehetséges. A progenitorok fejlődési irányának meghatározásában döntő lehet a bazofil granulocita-fejlődést támogató C/EBP α transzkripciós faktor és a hízósejtek kialakulásának kedvező MIF, melyek egymás transzkripcióját csendesítik.[5, 6]

Megjegyzendő azonban, hogy egyes források szerint a hízósejtek egy különálló útvonalon fejlődnek, és a bazofilok az eozinofilokkal osztoznak közös progenitoron.[7] Ezt támasztja alá, hogy emberben *in vivo* az IL-3 és a GM-CSF injektálása eozinofiliát és bazofiliát eredményez, valamint fokozza mindkét sejtvonaltól prekurzorainak mennyiségét. CML-es és AML-es betegekben a granulociták egy hibrid, eozinofil/bazofil fenotípust mutatnak.[8] Az eozinofil-bazofil rokonságot komplex génexpressziós elemzésekből származó adatok is alátámasztják.[9]

A bazofilok sokáig a hízósejtek árnyékában voltak, mivel számos folyamatban a hízósejtekkel közösen vesznek részt, hasonló morfológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Felszínükön hordozzák a nagy-affinitású IgE receptort, az Fc ϵ RI-et, valamint granulumentartalmuk is hasonló. A bazofilok vizsgálatát sok tényező nehezítette: vérben igen kis számban és éretten keringenek, s mivel még nem találtak a bazofilok sejtfelszínén expresszálandó specifikus markert, vérből való izolálásuk sokáig

nehézségekbe ütközött. Bazofil mintákból származó, nagy mennyiségű RNS izolálása is problémás. Továbbá, sokáig híján voltunk a bazofil-hiányos állatmodellnek is.[10] Az utóbbi időben viszont mindinkább jelentőséget nyer ez a hosszú ideig az érdeklődés perifériájára szorult sejttípus, ahogy jelentősége egyre több immunfolyamatban igazolódik.

A bazofilok a hízósejtekkel együtt az allergiás és fertőzőes folyamatok során játszott jelentős szerepük révén váltak ismertté, ahol hisztamin és leukotrién kibocsátásuk miatt jelentős effektor feladatokat látnak el. Mindkét sejttípus immunmoduláló funkcióval is rendelkezik, a Th2 irányt mindkettő befolyásolja. Egyrészt, mint fő Th2 citokineket termelő sejttípusok, a naív T-sejtek Th2 sejtekké való alakulását, valamint a B-sejtek IgE-termelő sejté való érését segítik elő. Mindkettő szerepet játszik a leukociták gyulladásos szövetekhez való toborzásában is. A bazofiloknak egy egérben újonnan felismert tulajdonsága, hogy részt vesznek a humorális immunmemória kialakulásában is. A hízósejtekről korábban is ismert volt, hogy a Th1 irányú folyamatokban is részt vesznek, a bazofilok kapcsán azonban csak nemrégiben jelent meg erre utaló közlemény.[11, 12]

Egyre több információval rendelkezünk arról, hogy a különböző kórokozó organizmusok a szervezetben rákos folyamatok kialakulását okozhatják, s régóta ismert, hogy a gyulladás, különösen abban az esetben, ha hosszú ideig fennáll, rákos elváltozásokhoz vezethet. Minthogy az elmúlt időszakban egyre nagyobb az érdeklődés a gyulladás és a rákos megbetegedések közötti kapcsolatok fiziológiája iránt, érdemes a hagyományosan gyulladásos sejtekként emlegetett hízósejteket és bazofil granulcitákat a rákos elváltozások kapcsán is szemügyre venni.

2.1 A hízósejtek

A hízósejtek számos „előkészített” gyulladásos mediátort tartalmaznak, más anyagokat pedig aktiváció hatására gyorsan szintetizálni képesek, melyekkel hozzájárulnak az IgE-mediált gyulladásos, illetve a késői típusú túlérzékenységi reakciók, az anafilaxiás folyamatok lefolyásához. A B-sejteket támogatják antitest-termelő plazmasejté való érésükben, szerepet játszanak a paraziták elleni immunválaszban, stimulálják az

eozinofilok kemotaxisát, aktivációját és proliferációját, támogatják a fagocitózist, továbbá számos, a tumorbiológiát érintő folyamatot is befolyásolni képesek: így a tumorfejlődést, a tumor-indukált angienezist, a szöveti átrendeződéssel járó folyamatokat és a tumorelles adaptív immunválaszt.

2.1.1 A hízósejtek sejtfelszíni expressziója

A hízósejtek aktivációja alapvetően kétféle módon mehet végbe: az aktiváció legrégebben ismert, legjelentősebb mechanizmusa FcεRI/IgE keresztkötése révén alakul ki, másrészt léteznek nem-IgE általi szignálok, mint a TLR-ok és ligandjaik (LPS és nukleinsavak)-, a C3a és C5a anafilatoxinok-, valamint bizonyos citokinek és kemokinek által kiváltott aktivációk.

Az I-es típusú túlérzékenységi reakciókhoz kapcsolt folyamatok az FcεRI-en keresztül valósulnak meg. Ezt a receptort a hízósejtek nagy mennyiségben expresszálják a felszínükön, és a receptor kifejeződését az IgE-koncentráció pozitívan befolyásolja.[13] Az aktiváció folyamata az antigén-specifikus IgE-től függ, melyet antigén-prezentációt és IL-4 stimulációt követően a B-sejtek termelnek.[14] Az IgG-receptorok közül az aktiváló hatású FcγRIII expresszálódik még egér hízósejtekben. Az FcγR-ok a megfelelő IgG-t kötik meg, de nem képeznek keresztkötést az FcεRI-gyel.[15]

Humán hízósejteken a TLR8 kivételével az 1-10-es számozású TLR-ok mindegyikét leírták, bár néhány tanulmányban nem tudták igazolni a TLR1, 4, 6 és 9 jelenlétét sem.[16] A legtöbb adat a TLR2-ről és -4-ről állt rendelkezésre. A TLR2 és a TLR4 mRNS expresszióját egyaránt detektálták éretlen és érett egér és humán hízósejtekben. Proteinszinten, a TLR2-t mutatták ki humán, köldökvér eredetű hízósejtekben és nazális polip hízósejtekben. A TLR2 és TLR4 expresszióját leírták továbbá egér intesztinális hízósejtekben, valamint egér és patkány peritoneális hízósejtekben.[17] A TLR2-n és a TLR4-en keresztül megvalósuló stimuláció különböző citokinprodukciónak eredményez. Az LPS az egér BMDC-ket TNFα, IL-6, IL-13, és IL-1β kibocsátására serkenti a TLR4-en keresztül, míg a peptidoglikán TNFα és IL-6, továbbá az IL-4, az IL-5 és az IL-13 Th2 citokinek produkcióját eredményezi a TLR2-n keresztül.[16] Amellett, hogy a TLR-hoz kapcsolódó szignalizáció citokin termeléshez vezet, a hízósejtek citokin-

kibocsátása a TLR-ok expressziójának upregulációját is okozhatja. Például, az IL-6 az eger hízósejtekben a TLR4 expresszióját fokozza. Ugyanakkor, a TNF nem befolyásolja sem a TLR2, sem a TLR4 fehérjék expressziós szintjét. A CCL5 viszont mind a TLR2, mind a TLR4 expresszióját csökkenti.[17]

Citokin-receptorok tekintetében hízósejteken viszonylag újonnan azonosították az IL-7R-t, az IL-16R-t, az IL-18R-t és az IL-33R-t, valamint a TSLP receptort.[17]

A különböző eredetű humán hízósejtek legalább 9 kemokin-receptort hordoznak: CXCR1-4, CX3CR1, CCR1, CCR3-5, melyek a megfelelő kemokinek által aktiválódnak. Érdekes módon, a kemokin receptorokon keresztül megvalósuló aktiváció nem pusztán a hízósejt kemotaxist, hanem egyes esetekben degranulációt vagy érést is kiválthat.[17]

Komplement-receptorok tekintetében a C3a és C5a anafilatoxinok receptorain kívül, a CR1/CD35-öt és a CR2/CD21-et is azonosították hízósejteken.[18, 19]

A humán köldökvér eredetű hízósejt progenitorok α 4-integrinnel, VCAM-1-gyel, PSGL-1-gyel, és más ligandokkal kötődnek az E-szelektinhez, és így a citokin-aktivált, humán endotél monolayerhez tapadnak. Ezzel magyarázható a hízósejtek felszaporodása a mukozális gyulladás helyén, ahol is a VCAM-1 és az E-szelektin fontos indukálható receptorok.[20]

Mivel a hízósejtek MHCII-t is hordoznak a felszínükön, így képesek antigén-prezentáló funkció ellátására. Az MHCII hízósejtekben intracellulárisan, a szekréciós granulumokban található, ahonnan a degranulációt kiváltó sejtaktivációs stimulusra ürül, és ilyenkor az MHCII sejtfelszíni expresszációja erősen megnövekszik.[21]

A hízósejteken megtalálható az őket az allergiás effektor szerepükben támogató CD48, valamint a degranulációt és a migrációt okozó S1P receptorok is.[17]

A hisztamin 4 receptorát azonosították, ezek: a H₁R, a H₂R, a H₃R és a H₄R, melyek a G-fehérje kapcsolt 7-transzmembrán receptorok családjába tartoznak. Ezek közül mind a 4-et azonosították már hízósejteken. Ezekén kívül felszínükön még szerotonin receptorok, purinerg receptorok is előfordulnak. A CD203c a hízósejteken szintén egy újonnan felfedezett receptor, amely az IgE-antigén keresztkötés következtében

aktiválódik, a szisztémás masztocitózisos betegek neoplasztikus hízósejtjeiben overexpresszálódik. A hízósejtek felszínén kortikotropin-kibocsátó hormon receptorok és endokannabinoid receptorok is megtalálhatók[17].

Mind a hízósejt progenitorok, mind pedig a hízósejtek nagy mennyiségű c-kit-et (CD117) hordoznak a felszínükön, amely erősen SCF-függő[22]. Az SCF pedig elengedhetetlen a hízósejtek túléléséhez, differenciálódásához, proliferációjához[23], a migrációjához[24] és egyéb funkcióihoz[25]. Galli és társai egy, cerkóffélékhez tartozó páviánokkal és jávai makákókkal végzett kísérletében az állatokat 21 vagy 28 napig szubkután rekombináns humán SCF-fel kezelték, aminek következtében számos szervben megnövekedett a hízósejtek száma[26].

A hízósejtek a felszínükön hordoznak még T- és B-sejt ligandokat: B7, PD-L1, OX40L, CD30L, CD40L, CCL19, 4-1BB.

A hízósejtek expresszálják a galektin-9 receptorát, a melanoma-sejtekre is jellemző TIM-3-at, melynek expressziója TGF β hatására hízósejtekben upregulálódik[27]. A galectin-9 tumorszupresszor szerepét már több ízben leírták, például emlőrákban[28] és melanomában[29]. A galectin-9 anti-tumor aktivitása továbbá abban is megnyilvánul, hogy a dendritikus sejt-érés stimulálása révén elősegíti az NK-sejtek[30] és a citotoxikus T-sejtek[31] aktivációját. HMC-1 humán hízósejtvonalban, a TIM-3 megnöveli a citokin-szekréciót, ugyanakkor szupresszálja a túlélést és a degranulációt[32].

A hízósejt-funkciók gátlásában szerepet játszó receptorok közé tartozik az alacsony affinitású Fc γ RIIb1 és az Fc γ RIIb2, melyek által az Fc ϵ RI általi aktiváció gátlása valósulhat meg. Ide tartozik a CD300a, amely azáltal gátolja a hízósejtek túlélését, hogy a c-kit hízósejtekre való hatását redukálja. A Siglec-8 gátolja a hisztamin és a prosztaglandin D2 szekrécióját és a Ca²⁺-influxot. Hízósejtekben a Siglec-7-et is azonosították. Továbbá, arra vonatkozóan is vannak adatok, hogy a CD72 redukálja az SCF-mediált proliferációt, a kemotaxist, és az MCP-1 (vagy CCL-2) produkciót humán hízósejtekben[17].

2.1.2 A hízósejtek által termelt, illetve kibocsátott molekulák

A hízósejtek granulumaiban tárolt molekulái közé tartoznak a szerotonin, a hisztamin, a heparin, a triptázok és a kimázok. Más molekulák a hízósejtek aktivációját követően *de novo* szintetizálódnak, ilyenek a lipid mediátorok: a PAF, a prosztaglandinok (PGG₂) és a leukotriének (LTB₄, LTD₄). Ezeken kívül Th1 (IFN γ , IL-2, IL-3, GM-CSF és TNF α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-33 és GM-CSF), Th17-hez kapcsolható (TGF β , IL-6, IL-1 β és TNF α) citokinek, kemokinek (CCL3, CCL5, MIP-1 β , MCP-1, MIP-2, CXCL8) és angiogén faktorok (VEGF, NGF, FGF) termelődnek a hízósejtekben.

Az egér hízósejt klasszifikáció a sejtek proteoglikán- és proteáz tartalmán alapszik. A peritoneális üreg, a bőr és a bél szubmukózájában találhatóak a kötőszöveti hízósejtek, melyek kétféle kimázt expresszálnak: az Mcpt-4-et és az Mcpt-5-öt, valamint az Mcpt-6 és Mcpt-7 triptázokat és MC-CPA (hízósejt karboxipeptidáz-A)-t[33]. A kötőszöveti hízósejtekkel ellentétben, érett mukozális hízósejtek differenciálódnak feregfertőzés esetén a bél mukózájának epitélrétegében, illetve asztmás betegek légútjaiban. Ezek a sejtek nagy mennyiségben szecernálnak Mcpt-1 és Mcpt-2 kimázokat[34, 35], valamint túlnyomórészt kondroitin-szulfát E-t és/vagy kondroitin-szulfát di-B láncokat. Az enterális feregfertőzések során megfigyelhető hízósejt-hiperpláziát hangsúlyozzák a hízósejt-hiányos állatokon történő vizsgálatok[36, 37], vagy az olyan egerekkel végzett kísérletek, amelyek nem képesek Mcpt1 kimáz szintézisére, és szignifikánsan késleltetett módon valósul meg bennük a *Trichinella spiralis* eliminálása[38]. A mukozális hízósejtek *in vitro* homológjainak differenciáltatása SCF, IL-3, IL-9 és TGF β 1 jelenlétében lehetséges[39].

A hízósejtek proteáz-tartalma fajonként különböző. Például az egér genom, ellentétben a humán genommal, egynél több kimázt kódoló gént tartalmaz. Humán hízósejtekben, a kimázokon kívül a katepszin-G is expresszálódik, és a 16-os kromoszóma szekvenálása során három funkcionális triptáz-gént azonosítottak.

Emberben a hízósejtek két különálló csoportja különböztethető meg: míg az MC_{TC}-k kimázt, triptázt és katepszin-G-t tartalmaznak, addig az MC_T-k csak triptázt.[40] Szervezetben való lokalizációjának alapján ez utóbbiakat tartják az egér mukozális hízósejtjeivel ortológ típusnak. Az egér kötőszöveti hízósejtek két triptáza, az Mcpt-6 és az Mcpt-7, minden valószínűség szerint megfeleltethető a humán α - és β -triptázoknak.

Az sokkal vitatottabb, hogy mely egér kimázok feleltethetők meg a humán kimáznak. Szekvencia-hasonlóság alapján az Mcpt-5, szubsztrát-specifititás és szöveti eloszlás alapján az mMcpt-4 hasonlít legjobban a humán kimázra. Továbbá, miután a bőr és a peritoneum összes kimotripszin-szerű aktivitásával is az Mcpt-4-et hozzák összefüggésbe, ezért valószínűleg az Mcpt-4 homológ a humán kimázzal. [33]

Meg kell jegyezni azonban, hogy a hízósejtek számos egyéb, nem „hízósejt-proteáz” jellegű proteázt is tartalmaznak: így lizoszomális katepszineket, granzimeket, neurolizineket. Humán köldökvér eredetű hízósejtekben kimutatták a granzim-D és a granzim-H proteázok jelenlétét is.[41, 42]

A különböző proteázok környezetbe való kibocsátásával a hízósejtek számos fiziológiás vagy patológiás folyamatot befolyásolnak. Gyulladásos folyamatokban kettős szerepük van: mind a pro-inflamatorikus, mind a protektív funkciókhoz hozzájárulnak attól függően, hogy az adott körülmények között milyen szubsztráttal kerülnek kapcsolatba. A hízósejt-proteázok proIL-1 β , proIL-18, CTAP-III, CCL6, CCL9, CCL15 és CCL23 kimáz általi kötődése aktivációt eredményez, míg a CCL3, CCL5, IL-6 és IL-13 kimáz általi kötése, illetve az IgE triptáz általi degradációja és az MC-CPA endothelin-1-degradációja gátló hatású. Természetesen annak megfelelően, hogy a főként hízósejt-proteázok proinflammatorikus hatása ismert, az aktiváló kötődések bírnak domináló funkcióval.[33]

A triptáz a vaszkuláris permeabilitásban vesz részt azáltal, hogy bradikininből kininogén létrejöttét okozza[43], és hogy fibrinogén megkötésére képes[44]. Mivel mind a triptáz, mind a kimáz képes a VI-os prokollagén fibrillumot bontani[45], a triptáz denaturálja a kollagént (zselatint)[46], a kimáz pedig az 1-es prokollagént ismeri fel[47], megállapítható, hogy ezek a proteázok jelentős szerepet játszanak a szöveti átrendeződéssel járó folyamatokban. Egy másik mechanizmus, amivel a kimázok közreműködnek az extracelluláris mátrix átrendeződésében, az a képességük, hogy a mátrix metalloproteázok (MMP-k) aktiválására képesek - pl. MMP-1, pro-MMP-3 (pro-stromelysin) vagy pro-MMP-9 - amelyek aztán az extracelluláris mátrix különféle fehérjéihez kötődnek. Továbbá, a triptáz képes kötni a légúti simaizomsejteken található sejtfelszíni PAR-2 (proteinase-activated receptor-2)-t, ami ezen sejtek proliferációját eredményezi.[48] A hízósejtekből felszabaduló triptáz a PAR-2 agonistája, parakrin

módon hat a vaszkuláris endotél- és tumor sejtproliferációra, ezzel segítve a tumorsejt inváziót és a metasztázist. Sőt, proangiogén aktivitása okán ígéretes target lehet rákterápiában.[49, 50] Számos tanulmány látott már napvilágot azzal kapcsolatban, hogy a hízósejtek által tárolt proteázok indirekt módon is hozzájárulnak az allergiás reakciókhoz és a légúti túlérzékenységhoz azáltal, hogy a neutrofil és az eozinofil granulocitákat a helyszínre csalogatják.[51]

A hisztamin egy biogén amin, mely a hízósejtek, bazofilok, a gyomor-bélrendszerben található enterokromaffin sejtek, valamint hisztaminerg neuronok granulumaiban tárolódik, valószínűleg heparin-kötött formában, ahonnan specifikus stimulus hatására ürül.[52, 53] A hisztamin szintézisének kulcsfontosságú enzime a hisztidin-dekarboxiláz (HDC), mely az L-hisztidint CO_2 felszabadulása mellett hisztaminná alakítja át. A HDC-t más sejtek is tartalmazzák, például a monocita-eredetű sejtek[54], továbbá számos egyéb, nem-klasszikus hisztamin-termelő. Ezek a sejtek nem tárolják a hisztamint, de szintetizálják azt, és késleltetve bocsátják a környezetbe.[55]

Már az 1960-as években feltételezték, hogy a hisztamin hatással van a sejt differenciálódásra és –proliferációra. 1960 óta számos esetben igazolták, hogy a hisztamin-szint szignifikánsan megemelkedik tumorszövetekben[56, 57], illetve a tumoros szövetek hisztamin-tartalma magasabb, mint a környező egészséges szöveteké.[56, 58-60] Számos malignus sejt típus expresszál hisztamin-receptorokat. A hisztamin hatása pedig a sejt típustól, a különböző receptor-altípusok egyensúlyától és a kötődés után bekövetkező jelátviteli útvonal aktivációjától függ. Például, a hisztamin a humán melanoma-sejtek növekedését az aktuális receptor-egyensúly alapján befolyásolja: a H_2R -on keresztül növeli, a H_1R -on keresztül pedig gátolja a sejtproliferációt.[57] Továbbá, a hisztamin fokozhatja a hízósejtek kemotaxisát a H_4R -on keresztül, míg a bazofilok mediátor-kibocsátását gátolhatja a H_2R -on keresztül.[61] Specifikus HDC-antiszenz oligonukleotiddal vissza lehetett szorítani a melanoma sejtek proliferációját[59], továbbá egér melanoma sejtekben az enzim túlexpressziója, valamint a hisztamin expresszió upregulációja megnöveli a metasztatikus kapacitást és egy agresszívabb fenotípus létrejöttét eredményezi.[62] A hízósejtek mellett a HDC overexpressziója figyelhető meg a tumorok környezetében, vastagbél-, emlő-, gyomor-, tüdőrák és leukémia esetén. Meg kell jegyezni azonban, hogy a legtöbb malignus

sejtvonal és vizsgált tumor expresszál HDC-t és magas koncentrációban tartalmaz endogén hisztamint, ami ürülni képes az extracelluláris térbe, számos olyan biológiai folyamatot szabályozva parakrin vagy autokrin módon, ami a tumornövekedéssel kapcsolatos.[63]

A hisztamin befolyásolja az angiogenezist is, s feltehetően mind pro-, mind anti-angiogén módon viselkedhet attól függően, hogy melyik hisztamin-receptorhoz kötődik.[64, 65] Ezen funkciójában a hisztaminon kívül minden bizonnyal az angiopoietin és az angiopoietin receptor is támogatja a hízósejteket.[66]

A hízósejtek által termelt hisztamin segíti az újonnan felfedezett mieloid-eredetű szupresszor sejtek (MDSC-k) immunszabályozó aktivitását. A monocita MDSC a tumor elleni védekezéshez járul hozzá, a granulocita MDSC pedig a paraziták elleni védekezésben jelentős. Mindkét MDSC-típus hisztaminra érzékeny, jóllehet a monocita MDSC szignifikánsan erősebben reagál a hisztamin proliferatív hatására.[67] Továbbá, MDSC-k felszaporodását tapasztalták számos rákos beteg perifériás vérében[68-70], ráadásul ez a jelenség kedvezőtlen prognózissal társul[71]. Az utóbbi évtizedben egyre növekvő érdeklődésnek örvendenek azok a vizsgálatok, amelyek a gyulladásos és a rákos folyamatok összefüggéseit célozzák. A hízósejtek és a MDSC-k interakciója az allergiás/gyulladásos és a rákos folyamatok között képezhet hidat.

A heparinról, ami napjaink legáltalánosabban használt antikoagulánsa, nemrégiben kiderült, hogy a XII-es koagulációs faktor aktiválásán keresztül bradykinint generál, ami által megnöveli a vaszkuláris permeabilitást és a leukocita adhéziót.[72]

A humán hízósejtek, a bazofilokhoz hasonlóan, expresszálnak leptint és leptinreceptorokat, és feltételezik a leptin autokrin és/vagy parakrin hatását a hízósejtekben.[73]

A hízósejtek által is termelt PAF aktiválja a vérlemezkéket, a vérlemezkékről pedig tudjuk, hogy az angiogenezis, az immunevázió és a tumor extravazáció támogatása által fokozzák a primer tumorok növekedését és terjedését.[74]

A perifériás szövetekben a PGD2 döntően a hízósejtekből származik.[75] A hízósejtekben termelődő LTB₄ pedig autokrin módon regulálhatja a hízósejt-számot a szövetekben, mivel a hízósejt-progenitorok számára kemoattraktánsot jelent.[76]

A hízósejtek szerotonin expressziója emberben és egérben is igazolt.[77, 78]

A gyulladásos citokinek kibocsátása krónikus gyulladás esetén szintén hozzájárulhat rákos elváltozások kialakulásához. Így például az IL-1-ről számos esetben igazolódott, hogy expressziója emelkedett a különböző tumorokban, és ez a jelenség általában kedvezőtlen prognózissal társul. A tumornövekedést és a metasztázisok fejlődését olyan pro-metasztatikus gének indukálása által okozza, mint a metalloproteinázok, kemokinek, növekedési faktorok és TGFβ. Az IL-1 az endotél adhézións molekulák – pl. ICAM-1 és VCAM-1 - expresszióját is képes stimulálni. Sőt, különös fontosságú, hogy az IL-1 egy potenciális proangiogén citokin, illetve a VEGF-kibocsátás is IL-1-függő folyamat. A potenciális IL-1 inhibitoroknak, amiket főleg autoimmun betegségek terápiájához fejlesztenek, valószínűleg a rákterápiában is hasznát veszik majd.

A TNFα kulcsszerepet játszik a gyulladás hosszabb távon való fennmaradásában, és a tumorból származó TNFα tartja fenn a szingenikus, xenogenikus és kémiai indukált tumorok növekedését és a fejlődését. A CXCR4-en keresztül direkt hatást fejt ki a tumorterjedésre, a CXCR4/CXCL12-n keresztül a tumor túlélésre, a CXCL12 és a VEGF expresszió indukciója által pedig a peritoneális tumor kolóniák új érfalainak stimulációjára.

Az IL-6 pro-tumorális szerepét igazolták többszörös mielómás megbetegedésben, valamint az IL-6-ot hepatocelluláris karcinómával is összefüggésbe hozták. Az autokrin IL-6 szerepét továbbá még kimutatták tüdő adenokarcinómában, ahol az onkogén STAT3-at aktiválja, valamint emlőrákban, ahol a Jagged-1/Notch szignalizációt aktiválja, valamint összefüggésbe hozták már a colitis-asszociált rákkal. Azt is kimutatták már, hogy a mieloid eredetű IL-6 egy kritikus tumor promotor intesztinális karcinogenezisben, ahol a normál, ill. a pre-malignus sejtek apoptózist gátolja, s a tumor-képző sejtek proliferációját pedig fokozza. Ebben a folyamatban kulcsszerepet játszik az NFκB/IL-6/STAT3 kaszkád.[79]

A hízósejtek – a bazofilokhoz hasonlóan - képesek IL-31 produkciójára, MPD-s betegek (Philadelphia kromoszóma negatív típusú mieloproliferatív rendellenességek) esetében pedig megfigyelték, hogy a normál hízósejtekénél szignifikánsan magasabb kibocsátás jellemzi az MPD-s hízósejteket a hisztamin és a leukotriének mellett az IL-31 tekintetében is.[80]

A bazofilokhoz hasonlóan, a humán hízósejtek is képesek a TSLP expressziójára IL-4 jelenlétében, az Fc ϵ RI keresztlinkálását követően.[81] A TSLP-nek pedig vizsgálják a tumorimmunológiában betöltött szerepét is.[82]

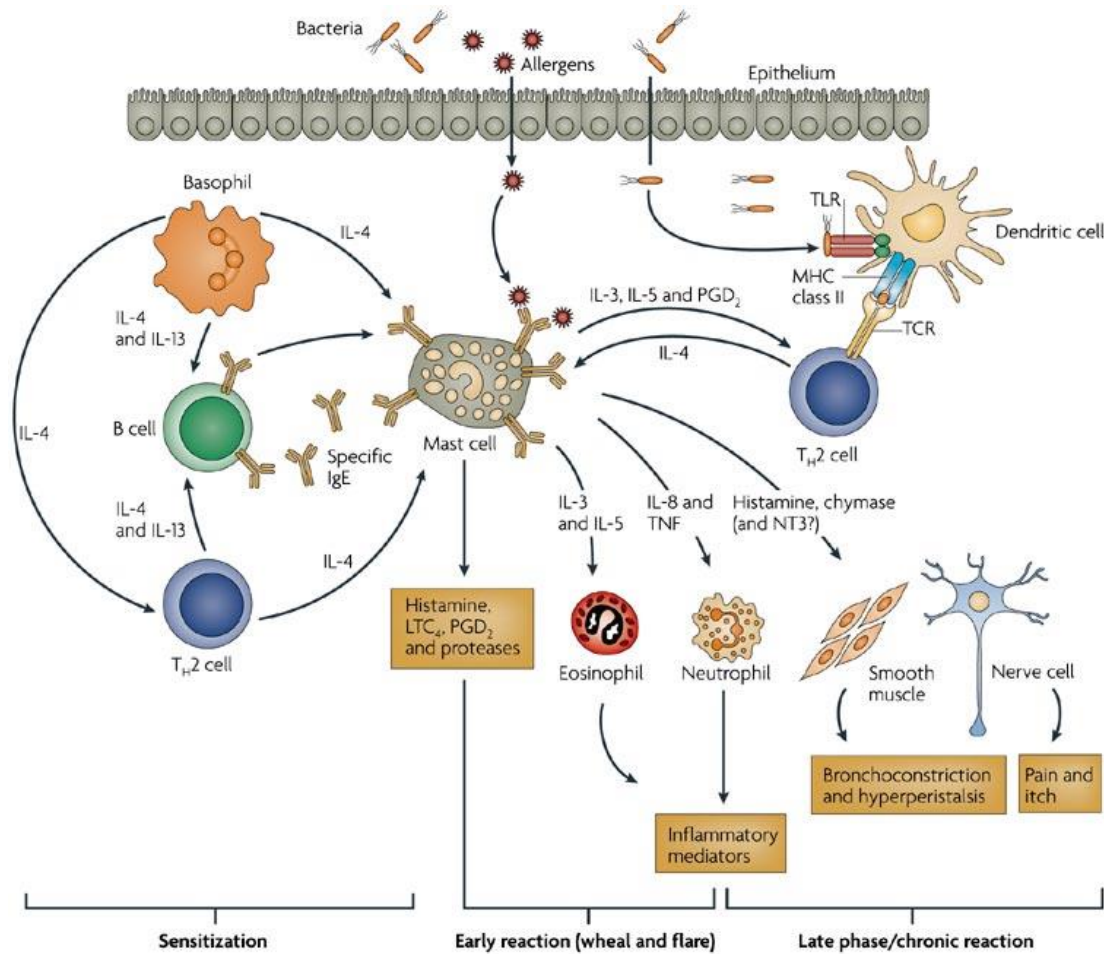
Ezenkívül még megfigyelhető a hízósejtekben IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 és GM-CSF expressziója.[83]

A kemokinek segítik a leukocitáknak a tumorok környezetébe való toborzását. Az IL-8/CXCL8 jelentős a melanoma-fejlődésben, mivel stimulálja a neoplasztikus növekedést, elősegíti a gyulladást és indukálja az angiogenezist.[84] A hízósejtek CCL2, CCL3 és CCL4 kemokineket is kibocsátanak.[85]

A hízósejtek VEGF-et expresszálnak, ahogyan azt a normális, a humán leukémiás, valamint a köldökvér-eredetű hízósejtek vizsgálata is igazolta.[86, 87] Ezenkívül bFGF-et is kifejeznek, továbbá tudjuk, hogy a TGF β , a TNF α , az IL-8, proteázok, hisztamin és a heparin is részt vesznek az angiogenezisben.[88]

A hízósejtek tumoros folyamatokban való jelentőségét támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint szignifikánsan magas számban jelennek meg hízósejtek mind egér-, mind humán rendszerben a tumorok környezetében, beleértve az emlő-, a hasnyálmirigy-, a tüdő és a gyomorrákot.[89-93]

A hízósejtek általa kibocsátott citokinek és kemokinek révén betöltött funkciókat szemlélteti az 1. ábra.



1. ábra. A hízósejtek hatása más sejtekre kibocsátott citokinjeik, illetve kemokinjeik révén.

[94]

2.2 A bazofilok

A bazofilok a hízósejtekhez hasonlóan a túlérzékenységi reakciók fő effektor sejtjeiként gyulladásos mediátorokat, illetve hisztamint tartalmaznak, más anyagokat *de novo* szintetizálni képesek, jellemzően Th2 citokineket termelnek, a B-sejteket támogatják antitest-termelő sejté váló alakulásukban, jelentősek a bakteriális-és féregfertőzések esetén, részt vesznek más immunsejteknek a gyulladás helyére való toborzásában és a humorális immunmemória kialakulásában.

A bazofilokról tudjuk, hogy szerepet játszanak AML-ben[95]. A bazofilok tumoros szövetekben való funkciójáról azonban nincs rendelkezésre álló adat, de mivel ők is

képesek a véráramból a szövetekbe való kilépésre[96], a jövőben elképzelhető hogy ilyen jellegű tanulmányok is születnek majd.

2.2.1 A bazofilok sejtfelszíni expressziója

A bazofilok legismertebb receptora az IgE/antigén kötő nagy-affinitású Fc ϵ RI, melyet a hízósejtek is nagy mennyiségben hordoznak, s mindkét sejtípus aktiválásának kulcsfontosságú tényezője. Ig-receptorok közül még Fc γ receptorokat is találunk felszínükön, melyeknek a bazofilok újonnan felfedezett funkciójában, az egerben azonosított humorális immunmemóriában jelentős szerepe lehet, mivel az antigén-kötött bazofilok általi IL-4 és IL-6 produkció Fc γ -lánc függőnek bizonyult, s a jelenség Fc ϵ RI hiányában is bekövetkezett.[8, 97]

A TLR2 és TLR4 közül - bár mindkettő jelenléte igazolódott mRNS és fehérjeszinten is - a bazofilek szelektíven csak a TLR2 ligandjára, a peptidoglikánokra reagálnak, hatásukra IL-4-et és IL-13-at expresszálnak. LPS hatásra azonban, mely a TLR4 ligandja, nem figyelhető meg hasonló hatás.[98, 99] Egy 2014-es publikációban számolnak be arról, hogy minden vizsgált humán bazofil mintában a TLR1-8-ig expresszáldott, valamint hogy a TLR-okon keresztüli aktiváció az IgE-mediált aktivációval szinergisztikusan hat, és a termelődő citokinek a Th2 differenciálódást segíti elő. Virális és bakteriális produktumok a formyl peptid receptorokon (FPRL1, FPRL2) keresztül elősegítik a bazofilok migrációját.[100, 101]

Bazofilok esetében szintén régóta ismert az IL-3 jelentősége, mely a sokféle irányú aktiváció mellett a differenciálódáshoz és a túléléshez is szükséges számukra, receptora a CD123 nagy mennyiségben található meg a bazofilok felszínén. A rajta keresztül befolyásolt aktivációs folyamatokat - a hisztamin, az IL-4 (hosszú idejű inkubációt követően), az eotaxin produkcióját, a CD69, a CD11b, a sejtfelszíni MMP-9 expresszióját - egy összefoglaló tanulmányban részletezik.[102] Természetesen más citokinreceptorok is előfordulnak a bazofilokon, köztük az IL-3 mellett még sok folyamatban szükséges IL-5 és GM-CSF receptorai (CD125, CD116), valamint az IL-18 receptora, valamint az újonnan felfedezett, Th2 irányba befolyásoló IL-33 receptora, az ST2 receptor.[103]

Találhatóak rajtuk komplementreceptorok (CR1, CR3, C5aR) különböző adhéziós fehérjék (LFA-3, ICAM-molekulák, CD11a, L-szelektin, P-szelektin), „homing” receptorok, valamint néhány, az angiogenezisben szerepet játszó receptor (VEGFRs, NRP1, NRP2, Tie1) is.[8, 66, 102, 104]

A hízósejtekhez hasonlóan, a bazofilok szempontjából is fontos, hogy hatásuk kifejtéséhez a megfelelő szövetekbe jussanak. Ebben működnek közre kemokinreceptoraik. A bazofilok számos kemokinreceptort expresszálnak (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CRTH2).[8, 105]

Érdekes módon, ahogy korábban a hízósejteken, a bazofilokon is kimutatták MHCII expresszióját[106], ám a keringésben levő humán bazofilokon nem sikerült igazolni, hogy ez a sejttípus képes lenne professzionális antigén-prezentációra.[107]

A bazofilok halálreceptorai közé tartozik a TRANCE, a TRAIL-1, a TRAIL-2 és a TACI. Megtalálható továbbá a bazofilokon a LAIR1 lízisgátló receptor is.[105]

Más fontos sejtfelszíni képletek is előfordulnak, mint pl. a CD40L, mely igen fontos a B-sejtekkel való sejt-sejt kontaktusban, ezáltal részt vehet mind a B-sejtek IgE-termelő sejtje való érésében, mind a humorális memóriában.

Serkentő és gátló hatásokért felelős a 2004-ben azonosított, Ig-szerű inhibitor hatású LIR-3 és az aktivátor hatású LIR-7, melyek neutrofilokon és eozinofilokon is megtalálhatóak.[108]

Azonosításhoz használhatóak a CD63 és a CD203 sejtfelszíni molekulák. A CD63 degranulációs markerként használható, mivel nem aktivált bazofilok felszínén nincs jelen, az intracelluláris granulumokban található. A CD203c, amely a bazofilok mellett megtalálható még hízósejteken és CD34⁺ progenitorokon, specifikus allergén, anti-IgE és anti-FcεRI hatására upregulálódik, és a CD63-mal ellentétben, kizárólag a sejtfelszínen fordul elő.[109, 110]

Jelentős perspektívákat jelenthet a gyógyászatban a bazofilok sejtfelszíni expressziós változásainak megismerése bizonyos betegségek kapcsán, mint ahogy az pl. a CML esetén már elkezdődött.[111]

Egy tanulmányban, melyben hízósejtek, bazofilok és monociták fenotípusát elemezték, a hasonlósági indexek vizsgálatakor azt tapasztalták, hogy a sejtfelszíni molekulákat a különböző funkciók szerint csoportosítva az adhéziónak, a komplementreceptorok és citokinreceptorok tekintetében erősebb a korreláció a bazofilok és a monociták között, mint akár a hízósejt-bazofil, akár a hízósejt-monocita párosoknál. A legnagyobb különbség a bazofilok és hízósejtek között a citokinreceptorok expressziójában mutatkozik. Ezzel ellentétben, immunglobulin-receptorok tekintetében nagyfokú hasonlóság mutatkozik a hízósejtek és bazofilok között a monocita-hízósejt, vagy a monocita-bazofil párosokkal összehasonlítva, melynek nyilvánvaló oka lehet a nagy affinitású FcεRI jelenléte a bazofilokon és hízósejteken, illetve annak monocitákon való hiánya.[112]

Ugyanakkor egy, az eozinofilokkal való összehasonlító vizsgálat azokkal alapvetően hasonló immunfenotípust állapított meg, a különbséget a két sejtípus között sejtfelszíni expresszió tekintetében mindössze a HLA-DR, a CD38 és az FCεRI expressziójában tapasztaltak.[113]

2.2.2 A bazofilok által termelt, illetve kibocsátott molekulák

A bazofilokban tárolt molekulák közé tartozik a hisztamin, szerotonin, bazofil proteázok. Bazofilokban megtalálható lipid mediátorok a PAF és az LTC₄. Ezenkívül, Th2 citokinek (döntően IL-4, IL-13 és TSLP), kemokinek (IL-8, CCL3, CCL4, CCL5) és angiogén faktorok (VEGF) produkciója jellemzi őket.

Biogén aminok tekintetében köztudott, hogy a hízósejtekből és a bazofilokból szabadul fel a hisztamin. Feltételezések szerint a bazofiloknak hisztamin- és leukotrién-kibocsátás szempontjából két csoportja különíthető el: az egyik, amelyik a populáció 1/5-ét alkotja, nem bocsát ki hisztamint és leukotriéneket az IgE aktiváció következtében. Ezek az ún. “nonreleaser” bazofilok. Ezzel szemben a “releaser” bazofilok kibocsátják ezeket az FcεRI keresztkötést követően. A nonreleaser bazofilok esetén feltételezték, hogy valami defektus érinti a korai szignáltranszdukciót, és valószínűleg a [Ca²⁺]-influxot is. Az IL-3, bár mind a hisztamin, mind a leukotriének kibocsátását elősegíti, csak 3 napig tartó IL-3 kezelés hatására képes a nonreleaser

bazofilokat releaser-ré alakítani.[114, 115] A két típus azonosítása óta igazolást nyert az is, hogy a nonreleaser fenotípus a Syk, mint kritikus tirozin-kináz elvesztésével magyarázható, ami nem feltétlenül jelenti a szignalizáció teljes hiányát, hiszen anti-IgE hatására több más expressziós változás mellett a Lyn expressziója is megnövekszik.

A hízósejtekhez hasonlóan, a bazofilok granulumaiban is tárolódik hisztamin, amely stimuláció hatására gyorsan felszabadul, gyulladást okozva. A hisztamin jelentősége igen sokrétű. (ld. hízósejteknél)

IL-3 hatásra a granzim-B szerin-észteráz enzim *de novo* szintézise indul meg bazofilokban (granzim-A és perforin szintézise, ill. felszabadulása nélkül). 6-24 órán belül kerül a granulumokba, és onnan exocitózissal ürül IgE-függő vagy attól független módon. Asztmás betegekben allergén hatására 18 órán belül felszabadul, az IL-13-hoz hasonló módon.[116]

A szerotonin a rágcsálók hízósejt-, illetve bazofil granulumaiban tárolt vazoaktív mediátor. RBL-2H3 patkány bazofil leukémia sejtekben való expressziójáról számos adat áll rendelkezésre.[117, 118]

A leptin-expresszió a bazofilokban mRNS-szinten nagy biztonsággal kimutatható. Az FcεRI keresztököt emelkedett leptin kibocsátást okozhat, míg az antigén hozzáadása előtti IL-3 preinkubáció nem módosítja szignifikánsan a leptin expresszió mértékét.[119]

Egészséges emberekből származó bazofilok a hízósejteknél jóval kisebb mennyiségű, érett és enzimatikusan aktív alfa és béta triptázt is tartalmaznak.[120] Az mMCP-11-ről kimutatták, hogy nem a hízósejtek által termelt triptázzal van szó, hanem a bazofilok által termelt, és prosztogandinok segítségével hízósejt-független módon vaszkuláris szivárgást okoz, és szerepe lehet a bazofilok általi gyulladásos válaszok létrejöttében.[121]

RNS-szinten kimutatták, hogy a bazofilok konstitutíven expresszálják az MMP-9-et és alacsony szinten az MMP-2-t is, de a kettő közül csak az MMP-9-et sikerült a sejtfelszíni expresszió vizsgálatával, továbbá a citoplazmából és a felülúszóból is kimutatni. Az MMP-9 expressziót IL-3 fokozza.[122] Hízósejtek is termelik az MMP-9

mátrix metalloproteinázt, melynek produkcióját számos faktor, például glükokortikoidok és flavonoidok is befolyásolhatják.[123]

A lipid mediátorok közül bazofilok esetében nagy jelentőséggel bír az LTC₄. Ismert, hogy a legtöbb aktivációs hatásra releaser bazofilokból hisztamin és LTC₄ szabadul fel nagy mennyiségben. A hisztamin és a leukotriének felszabadulása azonban nem minden esetben történik meg együttesen. Például egy nemrég megjelent tanulmányban leírták, hogy az LTC₄ a hisztamintól függetlenül is felszabadul, méghozzá a (házi)méh vénájában megtalálható szekretoros foszfolipáz-A2 direkt módon képes a bazofilok aktivációjára, ahol gyors szisztémás mediator kibocsátást okoz. Itt nagyon gyors LTC₄-kibocsátást találtak, míg az IL-4 kibocsátás ezt később követte, hisztamin felszabadulást pedig nem tapasztaltak.[124] Ehhez hasonlóan egy korábbi összefoglaló tanulmányban már leírták, hogy az FcεRI keresztökötés által aktivált ERK-k (ERKs - extracellular signal-related kinases) befolyásolják a bazofil LTC₄-produkciót, de a hisztamin, illetve citokin kibocsátást nem. Megemlítendő az IL-3 szerepe a folyamatban, mely bár az IgE-függő stimuláció hiányában aktiválja az ERK-t, de nem okoz LTC₄ kibocsátást, anti-IgE-vel együtt viszont kétszer akkora LTC₄ produkciót eredményez, mint az anti-IgE önmagában.[125]

Hasonlóképpen, az IL-3 képes az LTC₄ kibocsátásnak az elősegítésére C5a hatására bekövetkező degranulációs válasz során, önmagában azonban nem.[126]

Érdekes módon, a leukotriéneket is összefüggésbe hozták már tumoros folyamatokkal, feltételezik, hogy a hisztaminhoz hasonlóan kapcsolatot jelenthetnek a krónikus gyulladás és a tumorok kialakulása között.[127]

A bazofilok sokféle aktivációs hatásra (fMLP, C5a, PMA vagy FcεRI keresztökötés), IL-3 vagy thapsigargin (a citoszól Ca²⁺-koncentrációját növeli) jelenlétében - LTC₄ mellett PAF (platelet-activating factor)-ot is szintetizálnak. A cPLA2 az elsődleges foszfolipáz, mely szerepet vállal a leukotriének és a PAF szintézisében.[128, 129]

Bazofilokban - a hízósejtekkel ellentétben - a prosztaglandinok produkciója nem valószínű.[130]

A bazofilok kulcsfontosságú citokinjei az IL-4 és az IL-13, melyek a Th2 differenciálódásban játszanak aktív szerepet.

Néhány kísérletben *Nippostrongylus brasiliensis*-fertőzött egereket vizsgáltak, melyekben tipikusan Th2 irányú immunválasz alakul ki, így a bazofilok jelentősége is ebben a modellrendszerben jól megfigyelhető. Például bebizonyosodott, hogy a fertőzés következtében lezajló immunválasz függ mind az IL-4-től, mind az IL-13-tól, valamint az IL-4R α -tól is.[131] Megjegyzendő, hogy egy másik tanulmányban, melynek során egy *N. brasiliensis*-fertőzött egérben az IL-4 termelő sejtek tüdőben való felhalmozódását is vizsgálták, génkiütött egerek felhasználásával azt tapasztalták, hogy a bazofilok gyülekezése Stat6-függetlennek bizonyult, ám igényli az adaptív immunrendszert, T-sejt függő. A kísérletekből az is kiderült, hogy nem fertőzött egér tüdejében, tehát egészséges szövetben is találhatóak bazofilok, melyek konstitutíven expresszálják az IL-4 gént. Természetesen, a fertőzés hatására a bazofilok mennyisége a tüdőben megsokszorozódik.

Ugyanakkor, a hízósejtekről is ismert, hogy IL-4-et expresszálnak, az *N. brasiliensis*-fertőzött egér tüdejében sem nyugvó, sem fertőzött állat esetében nem találtak szignifikáns számú hízósejtet. Mivel a hízósejtek mellett az IL-4 termelésre képes NK T-sejtek és a $\gamma\delta$ T-sejtek közreműködését is kizárták, megállapítható hogy ebben a modellrendszerben a fő IL-4 termelő sejtek az eozinofilok és a bazofilok.[132]

Mind egér, mind humán tanulmányokban megerősítették, hogy a bazofilok képesek az IL-4 konstitutív expressziójára, míg az IL-13-ra nézve ez nem igazolt.[119, 132] Aktiváció hatására a bazofilokból az IL-4 gyorsan felszabadul (maximális szintjüket a keresztkötést követő 4. órában érik el), de egyes mintákban tárolt IL-4 is található, mely másodperceken belül képes ürülni a degranuláció során. Ezzel ellentétben az IL-13 felszabadulás lassabb, és a bazofilok nem tárolnak előkészített IL-13-at.[133]

A bazofilok IL-4 termelésének további jelentőségét jelzi, hogy asztmás betegekben allergén provokáció hatására a bazofilok a bronchialis mukózában felgyűlve, mint a fő IL-4 termelő sejtek tűnnek ki.[134] Asztmás betegek esetében a perifériás vér vizsgálatánál is igazolódott, hogy a bazofilok az elsődleges IL-4 és IL-13 termelő sejtek az antigénnel való aktivációt követő első 6 órában.[135]

A bazofilok a hízósejtekre is hatással vannak IL-4 expressziójuk révén, hiszen a felszabaduló IL-4 proinflammatorikus mediátorok (PGD₂, LTC₄) és számos citokin produkcióját eredményezi hízósejtekben, ezáltal a bazofilok befolyásolják a hízósejtek effektor funkcióit. Továbbá, az IL-4 kezelt hízósejtek TLR4-et expresszálnak, melynek LPS általi aktivációja Th2 citokinek felszabadulását eredményezi.

Megjegyzendő, hogy a hízósejtek IL-3, IL-5 és GM-CSF termelése viszont a bazofilok IL-4 szintézisét és hisztamin-szekrécióját okozza.[61]

Újabban egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak a bazofilokban a TSLP expressziójának. A bazofilok proteáz allergén aktiváció hatására Th2 citokineket termelnek, IL-4 mellett többek között egy IL-7-szerű citokint, valamint a thymic stromal lymphopoietint (TSLP-t) is. A TSLP is számos mechanizmus által serkenti a Th2 differenciálódást.[136] Az elmúlt 4-5 évben továbbá, a TSLP tumorimmunológiában betöltött szerepét is igazolták, egyes esetekben tumort segítő, más esetekben tumorokat gátló molekulaként.[82]

Noha az IL-25 (IL-17E) expressziója hízósejtekben is bizonyított FcεRI aktivációt követően, bazofilokban való expressziója azonban nagyobb jelentőségűnek látszik.[137] Egészségesek és allergiások perifériás véréből származó nyugvó, illetve aktivált eozinofiljaiban és bazofiljaiban jelentős IL-25 mRNS expressziót tapasztaltak, ugyanakkor *in vitro*-eredetű hízósejtekben alacsony maradt az IL-25 mRNS szintje PMA és ionomycin aktiváció hatására. Az IL-25 fehérje fokozott expresszióját is kimutatták a keresztkötés általi aktiváció következtében bazofilokban, sőt az expresszió mértéke allergiás betegekben kétszeresnek bizonyult.[138]

Az IL-25-ről tudjuk, hogy emeli az IL-4 gén transzkripcióját naív T-sejtekben az aktivációt követő 2. napon, a 3. napra még tovább fokozódik. A Th2 differenciálódás mellett az IL-25 szerepet játszik az effektor és memória Th2-sejtek funkcionális szabályozásában is.[139]

Asztmás és kontroll egyének perifériás véréből származó bazofileket vizsgálva az IL-6 mRNS expresszió konstitutívnak bizonyult, és ez nem változott szignifikánsan IgE keresztkötéssel történő aktiváció hatására sem.[119] Az IL-6 szerepet játszik a bazofilok érési folyamataiban. Autokrin hatást is kifejtethet, mivel mind egér mind humán

rendszerben kimutatták a bazofil prekurzorok általi expresszióját. Egér bazofil prekurzoraiban IL-3 vagy aggregált IgE fokozza az IL-6 mRNS expresszióját.[140] KU812 humán prebazofil sejtvonalban pedig az IgD serkenti az IL-6 szekréciót.[141]

A KU812 prebazofil sejtvonalban az IL-5 expresszióját is kimutatták[142], melynek szekrécióját alveoláris epiteliális sejtekkel való KU812 kokultúrában a trombin stimulálja.[143]

Egérrel végzett kísérletek során továbbá az IL-31 expresszióját egyéb, bazofilokban ismert Th2 citokinek mellett a papain erősen megnövelte.[136]

A bazofilok Th2 citokintermelése közvetlenül és a Th0-Th2 indukción keresztül, közvetve is serkenthetik a B0-sejtek IgE-termelő sejté való alakulását, így tehát az előbb felsorolt citokinek kettős szerepet játszhatnak Th2 polarizációs folyamatokban.

A bazofilok nemcsak a B-sejtek IgE-termelő plazmasejtté való érését, de az IgG₄-termelő plazmasejtek kalakulását is támogatják, hiszen az aktivált KU812 sejtvonal sejtjei és a köldökvér eredetű bazofilok a normál B-sejtek IgE és IgG₄ szintézisét (valamint szolubilis CD23 kibocsátást) indukálják IL-4 vagy IL-13 jelenlétében, valamint a CD40L-CD40 közvetlen sejtkapcsolaton keresztül.[144, 145]

Egy egér tanulmány szerint, melyben csontvelőből IL-3 jelenlétében differenciáltattak hízósejteket és bazofilokat, a hízósejtekkel való kokultúra nem volt képes a CD4⁺ T-sejtek Th2 irányú befolyásolására, míg a bazofilok kokultúrája a T-sejtekkel azokban IL-4 produkciót (Th2 befolyást) eredményezett még IL-12 (Th1 befolyást jelentő citokin) jelenlétében is. Sőt, az IL-4 hiányos bazofilok- bár nem voltak képesek a Th2 irány kialakítására - szupresszálták a Th1 irány létrejöttét, mely folyamatban feltehetőleg sejt-sejt kontaktus is szerepet játszik. A Th2 irányú befolyásolásra és a Th1 irány szupresszáálására IL-3 kezelt egerek májából és lépéből származó bazofilok is képeseknek bizonyultak.[146]

Egy friss tanulmány új megközelítésbe helyezi a bazofiloknak az allergiás betegségben oly sokat vizsgált hiperreaktív természetét. A bazofilokból az IgE-függő aktiváció hatására 4 órán belül IL-3 szabadul fel, ami autokrin módon hatva a bazofilok fenotípusát és funkcionális tulajdonságait az allergiás betegekből származó bazofilok

tulajdonságai irányába terelik.[147] A hízósejtek is expresszálnak IL-3-at, mely a szintén általuk termelt IL-5 és GM-CSF mellett a bazofilok IL-4 szintézisét és hisztamin szekrécióját okozza.[61]

Egy nemrég megjelent közleményben[11] feltételezik, hogy a bazofilok jelentősek a humorális immunmemória kialakulásában, melynek kulcsa az IL-6 és az IL-4 expressziója eger lép és csontvelő bazofiljai által az antigénnel való újratálalkozást követően. A másodlagos immunválasz során a bazofilok bizonyultak ezen citokinek fő forrásainak.

Az elsődleges immunizáció során a B-sejtek által termelt antigén-specifikus IgE az elsődleges immunizáció utáni elnyúlt időszakban a bazofilok Fc ϵ RI receptorához kötődik, majd az antigénnel való újratálalkozás során ezen a bazofilok hatékonyan kötik a szabad antigént, valamely Fc γ láncot tartalmazó receptoruk révén aktiválódnak, IL-4-et és IL-6-ot bocsátanak ki, valamint sejtfelszíni CD40L-et expresszálnak, ami által a B-sejtek proliferációját, Ig-produkcióját, plazmasejt-érését támogatják CD4⁺ T-sejtek jelenlétében. A folyamathoz tehát szükség van mind szolubilis, mind sejtkontaktus-függő faktorokra.[11, 148]

Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a hízósejtek nem vesznek részt a humorális immunmemória kialakításában. Egyrészt, a bazofilszám-csökkenés hízósejt-hiányos egerekben is szignifikánsan alacsonyabb antitest koncentrációt eredményezett az antigénnel való restimuláció után. Továbbá, azon lép vagy csontvelői eredetű sejtek, melyeket az adoptív transzferre használtak fel (ennek során az antitesttermelés növekedését detektálták, hogy igazolják az antigén-reaktív bazofilok szerepét az immunmemóriában), nem tartalmaztak érett hízósejteket, és minden IgE⁺ sejt a lépben és a csontvelőben bazofilnak bizonyult. Végül, a csontvelői eredetű *in vitro* hízósejtkultúrában IL-3-mal és SCF-fel differenciáltatva 1-3 hétig nem következett be B-sejt proliferáció, míg mind a csontvelőből differenciáltatott, mind a frissen izolált bazofilok B-sejt proliferációt okoztak.[11]

Mivel egyre több, bazofilok által termelt kemokint azonosítanak, valószínűleg az eddig véltnél nagyobb szerepet játszanak a bazofilok a késői asztmatikus válaszban (túl az olyan proinflammatorikus mediátorok kibocsátásán, mint amilyen az IL-4 és az IL-13)

azzal, hogy neutrofilokat, eozinofilokat, T-sejteket és monocitákat toboroznak a gyulladás területére.[119]

Először KU812 sejtekben igazolódott a GM-CSF, az eotaxin (CCL11), a MIP-5 és az IL-8 termelődése, ma már azonban a perifériás vér bazofiljaiban is kimutatták mRNS, valamint fehérjeszintű expressziójukat is. A GM-CSF, az eotaxin és a MIP-5 mRNS-ek szintje nem upregulálódik az Fc ϵ RI keresztkötés általi stimuláció hatására. Az IL-3 viszont az IL-8 expresszióját fokozza -mind mRNS, mind fehérjeszinten. Egy később tárgyalt microarray kísérlet fehérjeszinten is validált adataiból kitűnik, hogy a bazofilok az IL-8 mellett még MIP-1 α (CCL3)-t, MIP-1 β (CCL4)-t és RANTES (CCL5)-t is expresszálnak.[119]

Egér bazofilokban kimutatták az IgE-indukált CCL22 (MDC: macrophage derived cytokines)-szintézist, mely a CCR4-expresszáló sejtek kemoattraktánsa, így a Th2-sejteké is. Az MDC expressziójának mértéke asztmásokban és atópiás dermatitisben szenvedő betegek esetén emelkedett. A bazofilok monomer IgE hatására, specifikus antigén hiányában termelik[149].

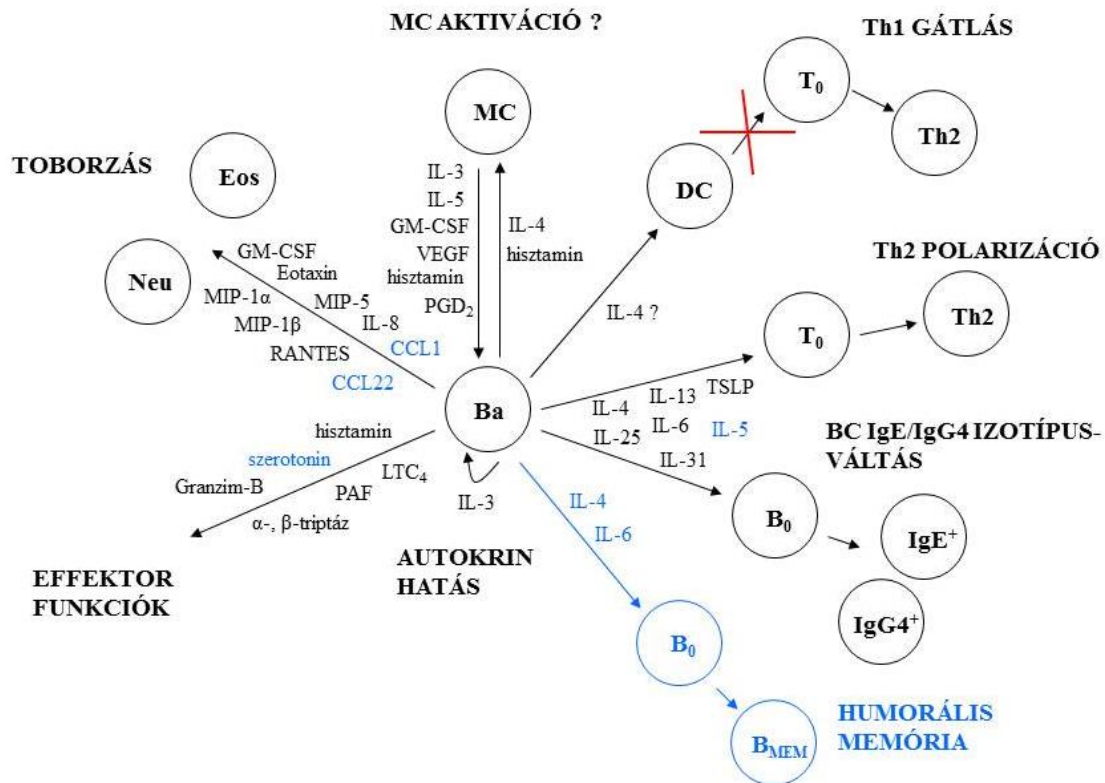
Egérrel végzett vizsgálatok bizonyították azt is, hogy az aktív papain direkt módon citokinprodukcióna készíti a bazofilokat (IL-2, IL-4, IL-13, IL-31, TSLP), valamint olyan kemokinek produkciójára is, mint a CCL1.[136] A CCL1-ről kimutatták szintén egérben, hogy allergia esetén upregulációt mutat a tüdőben és ott az eozinofilok felgyűlését okozza, ugyanakkor nincs behatással a Th2-sejtek aggregációjára.[150]

VEGF-ek tekintetében, melyek jelentős proangiogenikus faktorok, 3 VEGF-A izoforma: VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ és két VEGF-B izoforma: VEGF-B₁₆₇, VEGF-B₁₈₆ található meg bazofilokban.[104]

Az utóbbi két évtizedben jelentős lépést jelentett a bazofilok kutatásában specifikus markerek megtalálása, ilyenek a basogranulin, granular protein és a proBMP-1.[109, 151-153]

A bazogranulin IgE független és IgE függő módon is képes a bazofilokból felszabadulni, így alkalmas markere a bazofil aktivációnak. A szecernált bazogranulinnak egy része a sejtfelszínhez tapad.[154]

A bazofilok által termelt citokinek és kemokinek révén betöltött sejtfunciókat ábrázoltuk a 2. ábrán.



2. ábra. Bazofilok hatása más sejtekre kibocsátott citokinjeik, illetve kemokinjeik révén.

(Neu: neutrofilok, Eos: eozinofilok, MC: hízósejtek, Ba: bazofilok, DC: dendritikus sejtek, T₀: naív T-sejtek, Th2: Th2-sejtek, B₀: naív B-sejtek, IgE⁺: IgE-t termelő plazmasejtek, IgG4⁺: IgG4-et termelő plazmasejtek, B_{MEM}: memória B-sejtek)

2.3 MikroRNS-ek

A mikroRNS-ek csoportja olyan kis, evolúciósan konzervált, nemkódoló RNS-eket magába foglaló családot jelent, melynek tagjai poszttranszkripció szinten negatívan szabályozzák a génexpressziót azáltal, hogy a target mRNS-ük 3' mRNS le nem fordítódó régiójának komplementer szekvenciáihoz kötődve azok degradálódását vagy translációjának gátlását indukálják. A mikroRNS-ek speciális módon jönnek létre, a primer mikroRNS a sejt DNS-ében kódolt, a magban átíródik, majd a Dosha enzim feldolgozza, és a citoplazmába exportálja, ahol RNáz Dicerek tovább alakítják. Végül

19-23 nukleotid hosszúságú, egyszálú RNS-ek, vagyis érett mikroRNS-ek jönnek létre.[155] A mikroRNS-eket először a sejtfejlődésben és differenciálódásban fontos faktoroknak tartották, de később számos más biológiai folyamatban igazolódott a jelentőségük, úgy mint a sejt-differenciálódásban, az apoptózisban, a szignál transzdukcióban, a szervfejlődésben, valamint számos humán megbetegedésben, úgy mint a fejlődési rendellenességek, rákos megbetegedések (beleértve a hematológiai kórképeket), gyulladásos megbetegedések[156, 157], asztma[158] és fertőzések[158]. A különböző hematopoietikus szervek és sejttypusok meghatározott mikroRNS-profillal rendelkeznek, és a specifikus mikroRNS-készlet expressziója dinamikusan változik a sejtfejlődés során.[156]

A mikroRNS-ek elnevezése a következőképpen történik. Az érett mikroRNS-t „miR” elnevezéssel jelöljük, ami előtt teljes név szerepeltetésekor 3 betűvel jelöljük a fajt, utána pedig a szekvenciális számozás által adott szám következik. *-gal jelöljük, amikor a predomináns mikroRNS ellentétes karjáról van szó, amikor pedig nem teljesen egyértelmű melyik kar a predomináns, akkor a „miR” után -3p vagy -5p áll annak megfelelően hogy a 3’ vagy az 5’ végen található karról beszélünk.

2.3.1 A miR-223

A miR-223 a mieloid differenciálódás esszenciális és központi jelentőségű szabályozója, amely emberben feltehetően a granulocita-differenciálódást kontrollálja.[159]

Egy miR-223 génkiütött egér modellben bizonyították, hogy a miR-223 a granulocita-differenciálódásnak és a neutrofil aktivációnak negatív regulátora. A miR-223 null (miR-223 -/Y kiméra) egér csontvelőben megemelkedett számú granulocita progenitort találtak, valamint túléltek és hiperszenzitív keringő neutrofil-szerű fenotípusú sejtet (hiperszegmentált maggal és „hólyagosodva”) figyeltek meg, aminek rendellenes sejtvonalspecifikus marker expressziója volt. Ebben az egérben gyulladásos tüdőléziókat és bakteriális endotoxin hatására megnövekedett szövetroncsolódást is tapasztaltak.[160] Egy mikroRNS-microarray tanulmány szerint a miR-223 a humán

perifériás vér neutrofil granulcitáinak nagyobb mennyiségben előforduló és minden bizonnyal a legjelentősebb mikroRNS-e.[161]

Eozinofilok esetén a miR-223 hiánya az eozinofil progenitorok megnövekedett proliferációját eredményezte, amelyekben a miR-223 targetjeként funkcionáló IGF1R differenciálódása és upregulációja késleltetetté vált.[162]

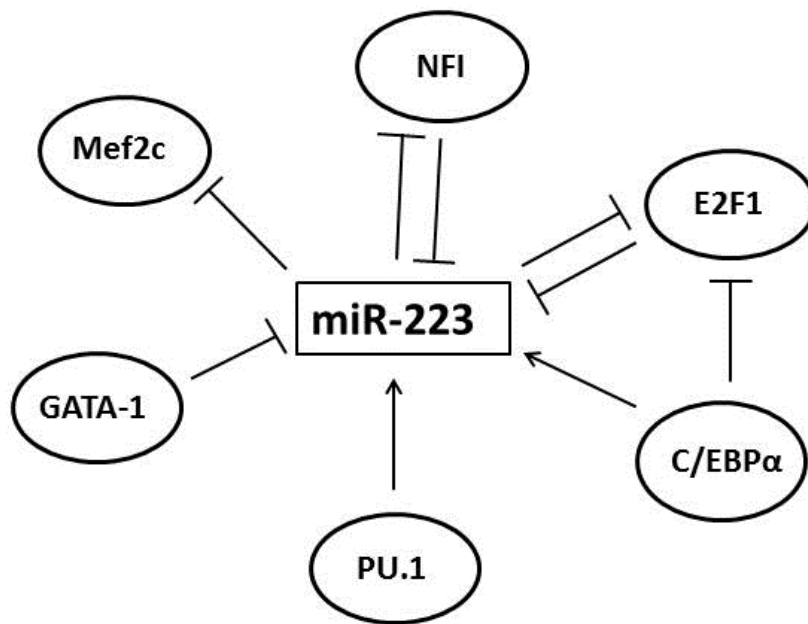
A miR-223 jelentősége azonban nem korlátozódik pusztán a granulocita differenciálódásra. A monocita/makrofág differenciálódás során a miR-223 az NF κ B aktivációt modulálja és az IKK- α -t, mint célgént köti, ami az NF κ B útvonal tagja. A monocita/makrofág differenciálódás során a miR-223, a miR-16 és a miR-15a expresszió csökken, míg az IKK- α -é megnövekszik, ami hozzájárul relB/p52 produkcióhoz és represszióhoz mind az általános, mind a nem-általános NF κ B útvonalakon keresztül. Így védi meg a makrofágokat a túlaktiválódástól, de valószínűleg szenzitizálja őket egy jövőbeni NF κ B-szignalizációs eseményre. Azt feltételezi, hogy bizonyos mikroRNS-eknek a differenciálódás során történő fogyása oda vezethet, hogy a makrofágok megfelelően képesek válaszolni a fertőzésre, azonban ez esetben további szövetkárosodás várható.[163]

A miR-223 az angiogenezist antagonizálja, és overexpressziója gátolja a megfelelő receptorok és a protein-kináz B aktivációjának mind a VEGF-, mind a bFGF-indukált foszforilációját. Ez a jelenség jól korrelál a β 1-integrinnek, mint a miR-223 targetjének, downregulálódásával.[164]

A miR-223 kapcsolódik az embrionális fejlődés során jelenlevő transzkripciós faktorhoz, az AN2/PAX6-ot vagy oculorhombinhoz, valamint glioblastomában tumorszupresszor szerepet játszik. A miR-223 overexpressziója és az AN2/PAX6 kiütése a glioblastoma-sejtek növekedését és invázióját okozza, valamint növeli a mátrix-metalloproteinázok, az MMP-2 és MMP-9, valamint a VEGF-A expresszióját.[158] Mellrákban a miR-223 a ráksejtek proliferációját és invázióját szupresszálja azáltal, hogy célgénként köti a Caprin-1-et.[165] A Caprin-1 egy széles körben expresszáldó, jól konzervált citoplazmatikus foszoprotein, amely a sejtciklus G1-S fázisának szabályozása által szükséges a normális fejlődéshez.[166]

A granulocita-differenciálódás egymást követő állomásai során a miR-223 expressziója szignifikánsan megnövekszik. Ebben a folyamatban a miR-223, mint célgénhez kapcsolódik a granulocita/neutrofil differenciálódáshoz szükséges NFI-A transzkripciós faktorhoz, amely a mieloid-specifikus C/EBP α faktorra versenyben áll a miR-223 promoteréhez való kötődésben. Ez a mikroRNS így egy szabályozási hurkot indukál a mieloid progenitor fejlődésben és differenciálódásban, ahol az NFI-A a miR-223 által downregulálódik, ugyanakkor a miR-223 a C/EBP α által upregulálódik. A miR-223 expresszió megnövekedése az inhibitoros NFI-A C/EBP α általi helyettesítése révén valósul meg.[159, 167] Más adatok alapján viszont a helyzet ennél bonyolultabbnak tűnik. A miR-223 gátolja a Mef2c transzkripciós faktort, ami a mieloid progenitor differenciálódás elősegítésében érintett, s amiről úgy tűnik, hogy felelős a miR-223 KO egerek neutrofiljainak fenotípusos és mennyiségbeli változásaiért.[160] A C/EBP-n kívül, a PU.1 mieloid transzkripciós faktor, a hematopoietikus differenciálódás kulcsregulátora is indukálja a miR-223 expressziót, míg a GATA-1 represszálja azt.[168] A C/EBP α a granulopoiesis során downregulálja a sejtciklus-regulátor E2F1 proteint, az E2F1 pedig gátolja a miR-223 transzkripciót, míg a miR-223 célgénként köti az E2F1-et és ezáltal blokkolja a sejtciklus fejlődést AML sejtekben, egy negatív autoregulátoros hurok segítségével tehát.[169] AML-ben pedig bizonyították, hogy a C/EBP α direkt módon hozzájárul a betegség fejlődéséhez.[170]

A miR-223 és az azt befolyásoló transzkripciós faktorok kölcsönhatásainak összefoglalása látható a 3. ábrán.



3. ábra. A miR-223 szabályozásában több autoregulátoros hurok vesz részt.

Az is bizonyított tény, hogy a miR-223 humán AML-ben downregulálódik.[169] Fiatal, citogenetikailag normális AML-es betegek esetén a RUNX1 transzkripciós faktor mutációja rossz klinikai kimenetelt sejtet, az ilyen paciensekben továbbá a C/EBPα downregulált.[171] Egy másik forrás szerint ezzel ellentétben azt feltételezik, hogy a miR-223 által mediált C/EBPα upreguláció egy lehetséges oka lehet annak, hogy AML-es betegek sejtjeiben a miR-223 erősen expresszálódik.[172]

Érdekes módon, egy nemrég megjelent tanulmányban Filkova és munkatársai azt vetették fel, korai reumatoid aritriszes (ERA-s) betegekben a miR-16 és a miR-223 expressziós szintjének monitorozása által prediktálható a betegség kimenetele. A szerzők alacsonyabb keringésben levő miR-16, miR-155 és miR-146 expressziós szintről számolnak be ERA-s betegekben és egészséges kontrollokban, mint reumatoid aritriszes (RA-s) betegek esetén. ERA-s betegekben összefüggést találtak a miR-223 szintje és a perifériális limfocita-szám között is. Úgy néz ki továbbá, hogy terápiás beavatkozást követően a magasabb keringésben levő miR-223 alapszint jobb prognózist jelent az ERA-s páciensek betegségének aktivitása szempontjából.[157]

Egy egér asztmamodellben microarray analízist végeztek allergén-expozíciónak kitett tüdőből 3 időpontban (rövid-, közepes- és hosszútávú expozíciót követően). Azt találták, hogy a miR-223 szignifikánsan upregulálódott a rövidtávú, és downregulálódott a közepes időtartamú aeroszol expozíciót követően. Továbbá, a miR-223 potenciális targetjeinek számító mRNS-ek (Arid4b, IL-6 és Lpin2) a rövidtávú expozíció alatt downregulálódtak. Hosszútávú behatásra a miR-223 esetén nem volt tapasztalható szignifikán expressziós változás.[173]

A miR-223 tuberculosis (TB) alatt erősen expresszálódik emberben, ahogy azt egy microarray kísérlet mutatta, amit aktív tüdő TB-s betegek és látensen fertőzött egészséges egyének bevonásával végeztek. A humán TB-hez hasonlóan, a miR-223 upregulálódott *Mycobacterium tuberculosis*-fertőzött egerekben is. Továbbá, a miR-223 deléciója a TB-re rezisztens egerek létrejöttét okozta, és úgy néz ki, hogy miR-223 makrofágokban az NFκB aktivitást, mieloid sejtekben a citokin kibocsátást szabályozza TB során. Egy másik, *Mycobacterium tuberculosis*-fertőzést követő 14 és 21 napos tüdőszövetet vizsgáló microarray-es mérés szerint, TB során a veleszületett immunrendszer sejtjeinek tüdőbe való özönlése - kemoattraktánsok szabályozása révén - a miR-223 által módosított folyamat. A Cxcl2-t, a Ccl3-at és az IL-6-ot a miR-223 új targetjeiként azonosították. A fertőzött, miR-223 KO állatok mortalitása 80-100%-os volt, míg csak 10%-os a vad típusú párjáé. A neutrofilok kiürülése meghosszabbította az állatok életét, míg miR-223 hiányában a morbiditás fő oka a neutrofil gyulladás, és az azt követő szöveti átrendeződés. Azt is feltételezték, hogy a miR-223 által célként kötött kemokinek, mint a CXCL2 és a CCL3, valamint a proinflammatorikus citokin IL-6 jelentős szerepet játszik ezekben a folyamatokban. Elmondható tehát, hogy a miR-223 a neutrofil kemotaxis negatív feedbackjét segíti elő.[174]

Huchenbaueret és társai kimutatták, hogy a mikroRNS duplexekről alkotott általános feltételezések ellenére, a miR-223 duplex mindkét karja aktív szerepet vállal. A miR-223*-nak, vagyis a hagyományosan nem funkcionálisnak hitt karnak, a mieloid progenitor sejtekben szabályozó szerepe van. Egy egér miR-223 knock out modellben, ahol a miR-223 „seed” régiója (az érett miRNS 5' 2-8. pozíciója) inaktivált volt, a kolónia-formáló sejt mennyiség szignifikánsan redukálódott. Szintén bemutatásra került

target predikciók és egy miR-223 KO – miR223 vad micorarray segítségével, hogy mind a miR-223, mind a miR-223* az IGF1R-hoz, mint célgénhez kapcsolódik. Tehát elképzelhető, hogy kooperatív szerepük van az IGF1R/PI3 tengelyen, ami a fejlődési és malignus folyamatok kulcs útvonala. A szerzők úgy találták hogy a mi-223* magasabban expresszáldott egészséges donorokban, mint AML-es paciensekben, és a magas miR-223* expressziós szinttel szignifikánsan összefüggésben állt egy magasabb rendű, teljes túlélés.[175]

2.3.2 miR-155

A miR-155 kritikus szerepet játszik a hematopoiesisben és szabályozza a limfocita homeosztázist és toleranciát.[176] Egy nemrég megjelent, a leukociták mikroRNS expressziós profiljának feltérképezésére végzett miRNS tanulmányban megállapítást nyert, hogy a miR-155 specifikusan a limfoid vonal sejtjeire jellemző, ugyanakkor neutrofilokban, eozinofilokban és mieloid dendritikus sejtekben downregulálódott.[177] Másfelől, a miR-155 hosszantartó expressziója a hematopoietikus őssejtekben megnövelheti az éretlen granulocita-számot in vivo.[178] A miR-155 a normális immunfunkciókhoz szükséges, hiszen a miR-155-hiányos egér erősen érzékeny a *Salmonella typhimurium*-fertőzésre. Rodriguezet és társai feltételezik, hogy az IL-4 promotor kötődése a c-Maf transzkripció faktorhoz a miR-155 által gátolható. Ez megnöveli annak lehetőségét, hogy a miRNS-ek jelentősek lehetnek a Th2 irányú humorális immunválaszokban is.[179]

A miR-155 számos malignancia esetén a legáltalánosabban overexpresszáldó mikroRNS. Összefüggésben áll emlő-, tüdő-, máj- és a limfoid rendszer rákos megbetegedéseivel, így tehát a miR-155-öt blokkoló ágensek kiemelkedő jelentőségűek lehetnek a rákterápiában.[180]

Egy egér asztma modell szerint a miR-155 szignifiánsan upregulálódik közepes időtartamú aeroszol expozíció következtében.[173] Azt is fontos megemlíteni, hogy azt a kromoszomális régió, ahol a miR-155 lokalizálódik (21kromoszóma, q21) korábban szintén összefüggésbe hozták már az asztmára való megnövekedett érzékenységgel a dél-dakotai hutteritáknál, egy alapító, európai őstől származó populációnál.[181]

Long és munkatársai a miR-155 upregulációját figyelték meg reumatoid arthritiszben betegek perifériális véréből származó mononukleáris sejtekben. A miR155 upregulációja az MMP3-expresszió csökkenését eredményezte.[182]

A miR-155 képes modulálni a mieloid sejteket néhány, a központi idegrendszert érintő patológiai folyamat esetén. A miR-155 expresszió szignifikánsan emelkedett a keringő CD14⁺ monocitákban Multiplex Sclerosis-os páciensek körében, az egészségesekkel összehasonlítva. A miR-155 transzfekciója megnöveli a TNF α , az IL-6, a CD80 és a CCR7 expressziót, míg a miR-155 által célgénként kötött gén, a SOCS1 expressziója lecsökkent humán mikrogliaokban. Másik oldalról, az IFN γ szignifikánsan megemelkedett a CD4⁺ T-sejt miR-155-transzfektált monocita-eredetű makrofág kultúra felülszójában.[183]

2.3.3 miR-16

A miR-16 egy erősen konzervált mikroRNS, az eukarióta sejtek szinte mindegyikében expresszálódik, s az elsők között hozták humán malignanciákkal kapcsolatba.[184] A miR-16 hatással van a sejtciklusra, gátolja a sejtproliferációt, elősegíti az apoptózist, befolyásolja a tumorigenezist.[185, 186] A miR-16 különböző ráktípusokban – CLL-ben[184, 187], prosztatarákban[188] és tüdőrákban[189] - gyakran deletált és/vagy downregulált. A miR-181a és a miR-16 expressziója napi változatosságot mutat humán leukocitákban.[190]

3 CÉLKITŰZÉSEK

A kutatók és klinikusok körében régóta ismert tény, hogy a gyulladásos folyamatok, kiváltképp ha huzamosabb ideig fennállnak, tumoros elváltozások beindulását eredményezhetik a szervezetben. Bizonyos például, hogy azok a gyulladásos mediátorok, melyek normál körülmények között rövidtávú gyulladást eredményeznek, majd down-regulálódnak, amennyiben nem megfelelően szabályozódnak, elősegíthetik bizonyos tumorok fejlődését, invazivitását, illetve angiogén aktivitását. Érdekes tehát a gyulladásban jelentős immunsejteket ilyen szemszögből is megvizsgálni. Arról, hogy a jól ismert gyulladásos mediátorok (pl. hisztamin) a tumoros folyamatokban milyen jelentős szerepet vállalnak, egyre többet tudunk. Az azonban, hogy milyen egyéb, eddig ismeretlen molekulák vesznek még részt a gyulladásban megismert sejtek tumoros folyamatokkal kapcsolatos funkcióiban, eleddig meglehetősen ismeretlen terület.

- Célunk volt tehát a hízósejtekben és az eddig sokszor méltatlanul mellőzött bazofilokban új gének, ill. mikroRNS-ek azonosítása.
- A differenciáltatott mukozális hízósejtekből végzett microrarray kísérlet alapján célunk volt olyan proteázok és proteáz-inhibitorok megtalálása, melyek expressziója hízósejtekben korábban még nem volt ismert.
- A kiválasztott gének real-time PCR-rel való validálása és a funkcionális releváns gének expressziójának fehérjeszinten történő megerősítése.
- A validált gének funkcióinak megbecslése az adott gének más sejtekben, szövetekben való szerepét tárgyaló irodalmi adatok alapján, és az így a felmerült funkciók igazolása vagy elvetése a mukozális hízósejtekben.

- Irodalmi adatok alapján kiválasztott mikroRNS-ek expressziójának bazofilokban való igazolása.
- A bazofilok differenciálódásához, illetve aktivációjához szükséges IL-3 hatása az azonosított mikroRNS-ek expressziójára nézve.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Csontvelői őssejtek izolálása és hízósejtté való differenciálása

2-4 hónapos Balb/c vad, nőstény egerek csontvelői sejtjeinek izolálása céljából, cervikális diszlokációt követően, steril eszközökkel mindkét femurt eltávolítottuk az egerekből, majd átmostuk a csontvelőt FCS-sel (Gibco BRL, Scotland). Ezt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel.

A c-kit pozitív populáció kinyerésére a sejtfelszíni CD117 alapján mágnesesen kétszer szeparáltuk a sejteket MACS LS szeparációs oszlopokon (Miltenyi Biotec, Németország). Valamennyi reagenst a gyártó leírása alapján használtuk.

A Balb/c-egér csontvelői őssejteket 10 % FCS-sel (Gibco BRL, Scotland), 100 U/ml penicillinnel, 0,1 mg/ml streptomycinnel, 1 mM piruváttal és 1 mM nem-eszenciális aminosavval (Sigma, MO, USA) kiegészített DMEM médiumban (Sigma, MO, USA) tenyésztettük. A tenyésztés 37°C-os, 5% CO₂-ot tartalmazó, vízgőzzel telített atmoszférikus környezetben történt.

A csontvelői szeparációból származó sejtekhez hozzáadtunk 40 ng/ml rekombináns egér SCF-et (Serotec, Nagy-Britannia) és 4 ng/ml rekombináns egér IL-3-at (Sigma, MO, USA), valamint néhány kísérletben emellett 2 ng/ml humán TGF-β1-et (Serotec, Nagy-Britannia) és 10 ng/ml IL-9-et (Sigma, MO, USA) is adtunk a tápoldathoz, így biztosítva a körülményeket az *in vitro* létrehozott, mukozális hízósejteknek megfelelő típusú sejtek differenciálódásához.

A tápoldat felét 4-5 naponta cseréltük.

20 nap differenciálódás után a sejtkultúra homogenitását alciánkék-safranin festéssel és áramlási citométerrel ellenőriztük.

A hízósejt-differenciálódás során bekövetkező génexpressziós változások vizsgálata céljából a sejtenyésztés 4. és 20. napján a sejtkultúra sejtjeiből mágneses szeparációt végeztünk a sejtfelszíni CD117 alapján, a fent említett módon.

4.2 Köldökvér eredetű hízósejtek izolálása

A köldökvér-eredetű humán mononukleáris sejtek szeparálása Histopaque oldat (Sigma-Aldrich, MO, USA) segítségével történő sűrűség alapú elválasztással, majd a CD34⁺ őssejtek mágneses szeparációja segítségével történt (Miltenyi Biotec, Németország). A sejtenyésztes komplett DMEM tápoldatban, 40 ng/ml SCF, 20 ng/ml IL-6 (Serotec, UK) és 3 μM lizofoszfátsav (Sigma-Aldrich, MO, USA) hozzáadásával történt. A tápoldat felét 4-6 naponta cseréltük. 6 hét elteltével a sejteket mágnesesen szeparáltuk egér anti-humán CD117 antitesttel (Pharmingen, CA, USA) és mágnesesen jelölt, kecske anti-egér IgG-vel (Miltenyi Biotec, Germany).

4.3 A peritoneális hízósejtek izolálása

A peritoneális sejtek kinyeréséhez szintén cervikális diszlokációt alkalmaztunk, majd kb. 15 ml jéghideg PBS-t injektáltunk a hasüregbe. 1-2 perces inkubációt követően a folyadékot kiszívtuk, jégre tettük, majd még egyszer megismételtük a folyamatot.

Ezt követően a sejteket a sejtfelszíni CD117 alapján mágnesesen kétszer szeparáltuk MACS LS szeparációs oszlopokon (Miltenyi Biotec, Németország).

A sejtkultúra homogenitását alciánkék-safranin festéssel és áramlási citométerrel ellenőriztük.

4.4 Toluidinkék és alciánkék-safranin festés

A hízósejtkultúrából vett kis aliquotokat tárgylemezre citocentrifugáltuk (Shandon Cytospin3 Cytocentrifuge), a centrifugált sejteket a festés előtt 10 percre jéghideg metanolba helyeztük, majd 0,1 %-os toluidinkék (pH 1) (Sigma-Aldrich, MO, USA) vagy alciánkék-safranin (Sigma-Aldrich, MO, USA) oldatban inkubáltuk 45 percig, szobahőmérsékleten. A pozitív sejtek arányának (toluidinkék esetében a metakromáziás sejtek aránya) meghatározását követően a min. 90%-os tisztaságú sejtkultúrákat használtuk fel.

4.5 Hízósejtek vizsgálata áramlási citometriával

PBS-sel való mosást követően a mintákat 25 percig inkubáltuk az ellenanyaggal szobahőmérsékleten, majd centrifugáltuk. A következő ellenanyagokat használtuk fel kísérleteink során: anti-humán CD117 PE, anti-egér CD117 APC, anti-egér B220 PE, anti-egér CD11b PE (Pharmingen, CA, USA), egér anti-humán triptáz, egér anti-humán kimáz (Chemicon, CA, USA) és anti-egér IgG FITC. Végül a minták mosása után a mérés FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, USA) műszeren történt.

Intracelluláris áramlási citométeres analízis előkészítése során a sejtek jelölését megelőzően a mintákat 2%-os PFA-ban (Sigma-Aldrich, MO, USA) fixáltuk 20 percig, majd 0,1 %-os szaponinban (Sigma-Aldrich, MO, USA) permeabilizáltuk.

4.6 RNS-izolálás, minőségellenőrzés és real-time PCR

A különböző hízósejt mintákból RNS izolálást végeztünk RNeasy Isolation Kit (Qiagen, CA, USA) segítségével. A teljes RNS mennyiségi és minőségi ellenőrzése Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) berendezés felhasználásával történt. Mind a Real-time PCR, mind a microarray kísérletekhez csak azon mintákat használtuk fel, melyek esetében az RNS integritási szám (RIN) 8.0 fölötti, a gékép tiszta és DNS szennyeződés nem volt kimutatható a hisztogramjukon.

1 U MuLV Reverz Transzkriptáz (Applied Biosystems, CA, USA) enzim segítségével 1 µg RNS-t írtunk át random primerek (Promega, WI, USA) felhasználásával 42 °C-on, 55 percig, majd inaktiváltuk a MuLV enzimet 95°C-on, 5 percig.

A real-time PCR-reakciót 25 µl végtérfogatú, 1,5 µl cDNS-tartalmú mintákkal végeztük el, ABIPrism 7000 berendezés segítségével (Applied Biosystems, CA, USA). Minden reagenst a gyártó leírása alapján használtunk.

4.7 Microarray és IPA

A microarray kísérletekhez Agilent Mouse Oligonucleotide 22K (Toxicology) chipet használtunk. A GeneSpring 7.3 szoftverből származó génexpresziós adatokat tovább

analizáltuk Ingenuity Pathway Analysis alkalmazás (Ingenuity Systems, CA, USA) segítségével.

4.8 Western-blot analízis

A sejteket lízispufferben (100 mM Tris, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA, 2 mM NaF, 10 µg/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 10 mM Na-vanadát, 1% aprotinin) denaturáltuk, majd Bradford-módszerrel meghatároztuk a minták fehérje-tartalmát. Mintánként 15 µg fehérjét denaturáltunk és redukáltunk β-merkaptóetanolban 100 °C-on 5 percig, majd futtattunk 10 %-os SDS-PAGE segítségével. A futtatás eredményét Immobilon-P membránra (Millipore, MA, USA) blottoltuk. Molekulasúly markerként egy „full-range Rainbow”-t használtunk (Amersham Biosciences, NJ, USA). A membránokat 10% tejporos PBS-tartalmú oldattal blottoltuk 1 órán át majd az elsődleges ellenanyagot 1% tejpor-és 0,1% Tween-20 tartalmú (Sigma, MO, USA) PBS-oldatba helyeztük 2 óra hosszára, szobahőmérsékletre. Erőteljes Tween-es PBS-ben történő mosás után a HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltattuk 45 percig. Az előhívás ECL Plus Western Blotting Detection System segítségével történt (Amersham Biosciences, MJ, USA).

Housekeeping kontrollként anti-tubulin ellenanyagot használtunk.

Munkánk során a következő antitestek kerültek felhasználásra: nyúl poliklonális anti-N-terminális HtrA1 antitest (Abgent, CA, USA 1:250-es hígításban), egér anti-humán HtrA1 (R&D Systems, MN, USA), patkány anti-tubulin antitest (Serotec, UK, 1:1000-es hígításban), anti-patkány HRP (1:10000-es hígításban), anti-egér HRP (1:10000-es hígításban), anti-nyúl HRP (1:8000-es hígításban).

Valamennyi reagenst a gyártók javaslatai szerint használtunk.

4.9 ELISA assay-k

A hisztamin ELISA kereskedelmi forgalomból származott (Beckman Coulter, CA, USA 0,5 nM szenzitivitás). A sejt kultúra felülszójában található HtrA1 fehérje detektálására saját fejlesztésű ELISA-t használtunk. Maxisorp lemezek felszínét (Nunc, Denmark) nyúl poliklonális anti-HtrA1 N-terminális antitesttel (0,5 µg/lyuk, 100 µl-es térfogatban)

inkubáltunk egy éjszakán keresztül, majd blokkoltuk 1% BSA-t tartalmazó PBS + 0,5% Tween-20 oldatban. Elfogó antitest gyanánt monoklonális anti-humán HtrA1-et alkalmaztunk, 1 µg/ml-es koncentrációban, majd másodlagos antitestként HRP-konjugált anti-egér antitestet, 1:10000-es hígításban. A reakciót végül TMB-szubsztrát segítségével tettük láthatóvá, 2N kénsavval állítottuk le, majd 450 és 540 nm-en olvastuk le (Labsystems Multiscan MS Reader).

4.10 Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálat

A humán hízósejtkultúrák aliquotjait tárgylemezre citocentrifugáltuk, majd 10 percig 2%-os paraformaldehidben fixáltuk őket. A mintákat ezután 3-szor mostuk mosópufferben (5% BSA és 0,05% Tween-20 tartalmú PBS), majd az aspecifikus kötést kialakító részek blokkolására nem-immun egér szérummal (DAKO, Denmark) inkubáltuk 45 percig, szobahőmérsékleten. A sejteket egér anti-humán HtrA1 antitesttel jelöltük (5 µg/ml), 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd PBS-ben mostuk 3-szor. A sejteket ezután FITC-cel jelölt anti-egér másodlagos antitestekkel inkubáltuk 40 percig szobahőmérsékleten, és Daunorubicinnal (Sigma-Aldrich, MO, USA) festettük. Az elkészített tárgylemezeket Bio-Rad MRC 1024 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk, fényforrásként argon/kripton vegyes gázlézert alkalmazva. A lézert 480 nm-es hullámhosszon gerjesztettük. Minden negatív kontroll (melyek előkészítésekor az elsődleges antitestet kihagytuk) esetében a fluoreszcens háttér elhanyagolhatónak bizonyult.

4.11 Statisztikai elemzés

Az adatoktól függően egyszempontos ANOVA-t, majd „Tukey’s all pairwise multiple comparison”-t; illetve Student-féle t-próbát alkalmaztunk.

Az adatok kiértékeléséhez Excel-t, illetve Statistica 7-es verziójú szoftvereket használtunk.

4.12 Humán vérminták

A felhasznált perifériás vérminták normál felnőtt egészséges véradók vérmintái, melyek az Országos Vérellátó Szolgálattól származnak. A teljes kísérleti periódus alatt az 1975-ös

Helsinki Deklarátum útmutatója és szabályrendszere alapján jártunk el, és a kísérletek a Magyar Tudományos Etikai Bizottság jóváhagyásával történtek.

4.13 Bazofilok perifériás vérből való immunomágneses szeparálása és IL-3-mal való *in vitro* stimulációja

Bazofil granulociták perifériás vérből való izolálására egy kétlépéses módszert alkalmaztunk, melynek során első lépésben sűrűség alapú szeparálást végeztünk HetaSepTM (StemCell Technologies Inc., Canada) segítségével, majd állómágnes és az EasySep Human Basophil Enrichment Kit (StemCell Technologies Inc., Canada) felhasználásával a bazofil sejteket negatív izolálással választottuk el. [191] Az izolált bazofil populációk tisztaságát FACSCalibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel (FSC/SSC) és May-Grünwald (Sigma-Aldrich, MO, USA) festéssel igazoltuk.

A humán bazofil mintákat 10% FCS, 100 U/ml penicillin és 0.1 mg/ml streptomycin tartalmú komplett RPMI médiumban inkubáltuk 100 percig 10 ng/μl hIL-3 (Sigma-Aldrich, MO, USA) jelenlétében vagy hiányában, $3-5 \times 10^5$ sejt/well vagy lyuk elosztásban, 96-lukú lemezben. A klasztereket formázó élő sejt kultúrákat 37°C-os inkubátorral kiegészített Nikon Diaphot TMD-EF típusú mikroszkópban fényképeztük le (Nikon Inc., Japan).

4.14 A humán bazofil sejtek festése May-Grünwald festékkel

Az izolált bazofil mintákból vett kis aliquotokat tárgylemezre citocentrifugáltuk (Shandon Cytospin3 Cytocentrifuge), majd 3 percig 0,25% May-Grünwald (Sigma-Aldrich, MO, USA) oldatba mártottuk.

4.15 A humán bazofil granulociták mikroRNS-einek izolációja és detektálása

A miRNS izolációhoz, illetve kimutatáshoz egyaránt TaqMan MicroRNA Cells to Ct Kit (Applied Biosystems, CA, USA)-et használtunk, a gyártó utasításai szerint megadott módon. A génexpressziós analízishez $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztunk. A delta-delta C_t értékek normalizálásához RNU48-at, mint endogén kontrollt alkalmaztunk.[192]

A real-time PCR amplifikációkhoz a TaqMan microRNA Assay-k szekvencia-specifikus primereit használtuk (RNU48 Assay ID 001006, hsa-miR-16 Assay ID 000391, hsa-miR-155 Assay ID 002623, hsa-miR-223 Assay ID 002295) ABIPrism 7000 berendezésen. A technikai beállításokhoz a kísérletek megkezdése előtt egy előkísérletet végeztünk, a gyártó utasításai szerint (az adatok itt nem kerülnek részletezésre).

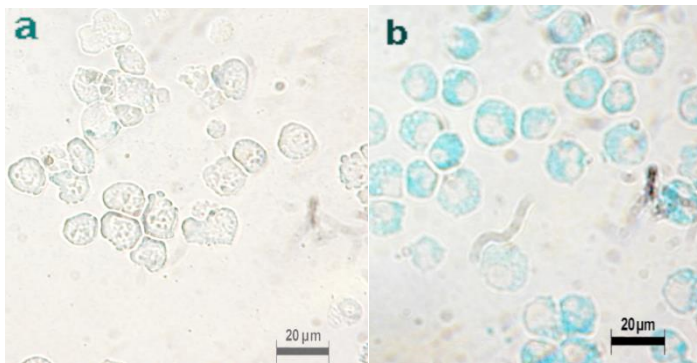
4.16 A miRNS-ekre vonatkozó target predikció és útvonal-elemzés

A hsa-miR-223, hsa-miR-155 and hsa-miR-16 esetében lehetséges potenciális targetek azonosítása érdekében 'multiple' miRNS elemzést végeztünk DIANA-mirPath software segítségével. Az általunk használt 'multiple' miRNA analízis olyan útvonalak azonosítását végezte el, amelyek a 3 miRNS esetében együttesen megvalósulhatnak. Ezek közül is azon útvonalakat kerestük, melyeket az 5 kereső algoritmusból legalább 3 egyaránt azonosított. Közöttük szerepelt az 'FcεRI szignalizációs útvonal', valamint a 'Hisztidin metabolizmus útvonal' is, melyek számos bazofil granulocita funkcióval is kapcsolatba hozhatóak.

5 EREDMÉNYEK

5.1 A csontvelői CD117⁺ sejtek mukozális hízósejteké történő differenciáltatása

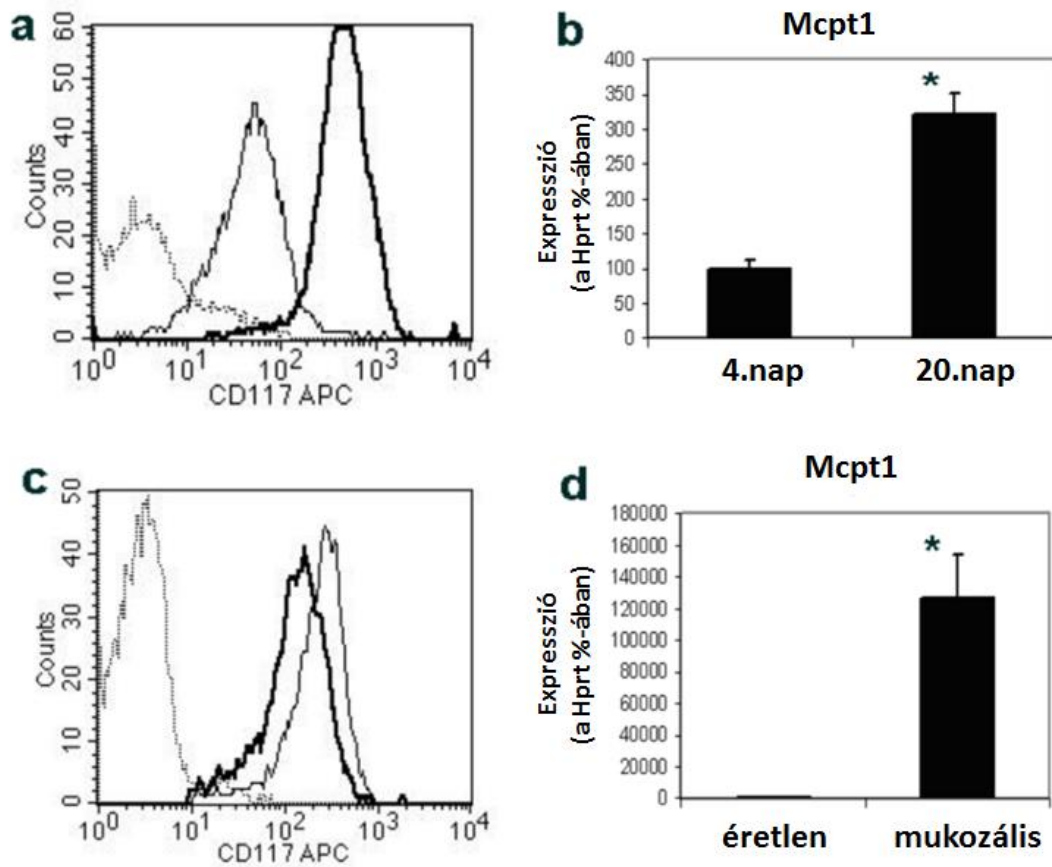
Egér mukozális hízósejtek *in vitro* differenciáltatása érdekében, a csontvelőből izolált CD117⁺ sejteket IL-3+SCF+IL-9+TGFβ jelenlétében tenyésztettük, majd a differenciálódás két különböző időpontjában mágneses szeparációt végeztünk a sejtfelszíni CD117 expresszió alapján. Az első időpont - a sejt differenciálódás 4. napja – a differenciálódás olyan stádiumát jelenti, melyben a sejtek jellemzően hízósejt progenitoroknak felelnek meg. A teljesen érett mukozális hízósejtek a differenciálódás 20. napján izolált sejteknek felelnek meg. Az általunk vizsgált sejtpopulációk tisztasága 95%-osnál nagyobb volt, ahogyan azt áramlási citometriával igazoltuk (5.a ábra). Alciánkék-safranin festéssel negatívnak bizonyultak a 4 napos sejtek (5.b ábra), valamint esetükben csökkent Mcpt1 expresszió volt megfigyelhető. Ezzel szemben a 20 napos sejtek alciánkék-safranin festéssel kékre színeződtek (4. ábra), és esetükben jelentős Mcpt1 expresszió volt megfigyelhető – ezáltal bizonyítva, hogy ez az érett típus a mukozális hízósejtek irányában elköteleződött sejteknek felel meg.



4. ábra. A differenciálódó egér mukozális hízósejtjeiből származó sejtpreparátum festődése alciánkék-safraninnal.

- a) IL-3, SCF, IL-9 és TGFβ jelenlétében differenciáltatott hízósejt-progenitorok.
- b) A 20. napon szeparált mukozális hízósejtek.

Továbbá, az IL-3+SCF+IL-9+TGF β jelenlétében 20 napig differenciáltatott sejtek esetében alacsonyabb c-kit expresszió volt megfigyelhető, mint az IL-9 és TGF β hiányában tenyésztett 20 napos populáció esetében[193] (5.c ábra). Sőt, az alacsonyabb sejtfelszíni c-kit expresszió mellett magasabb mRNS expressziót mutattak Mcpt1-re nézve, ahol az Mcpt1 az érett mukozális hízósejtek jellemző proteázának génje (5.d ábra). Ezen eredmények jól korreálnak azon korábbi feltételezésünkkel, hogy a szóban forgó sejtek az érett mukozális hízósejtek megfelelői.



5. ábra. IL-3, SCF, IL-9, TGFβ1 jelenlétében érett mukozális hízósejtek jönnek létre 20 napos sejtkultúrában, ahogy azt a csak IL-3 és SCF-tartalmú sejtkultúrában differenciáltatott éretlen kontroll sejtekhez viszonyítva láthatjuk.

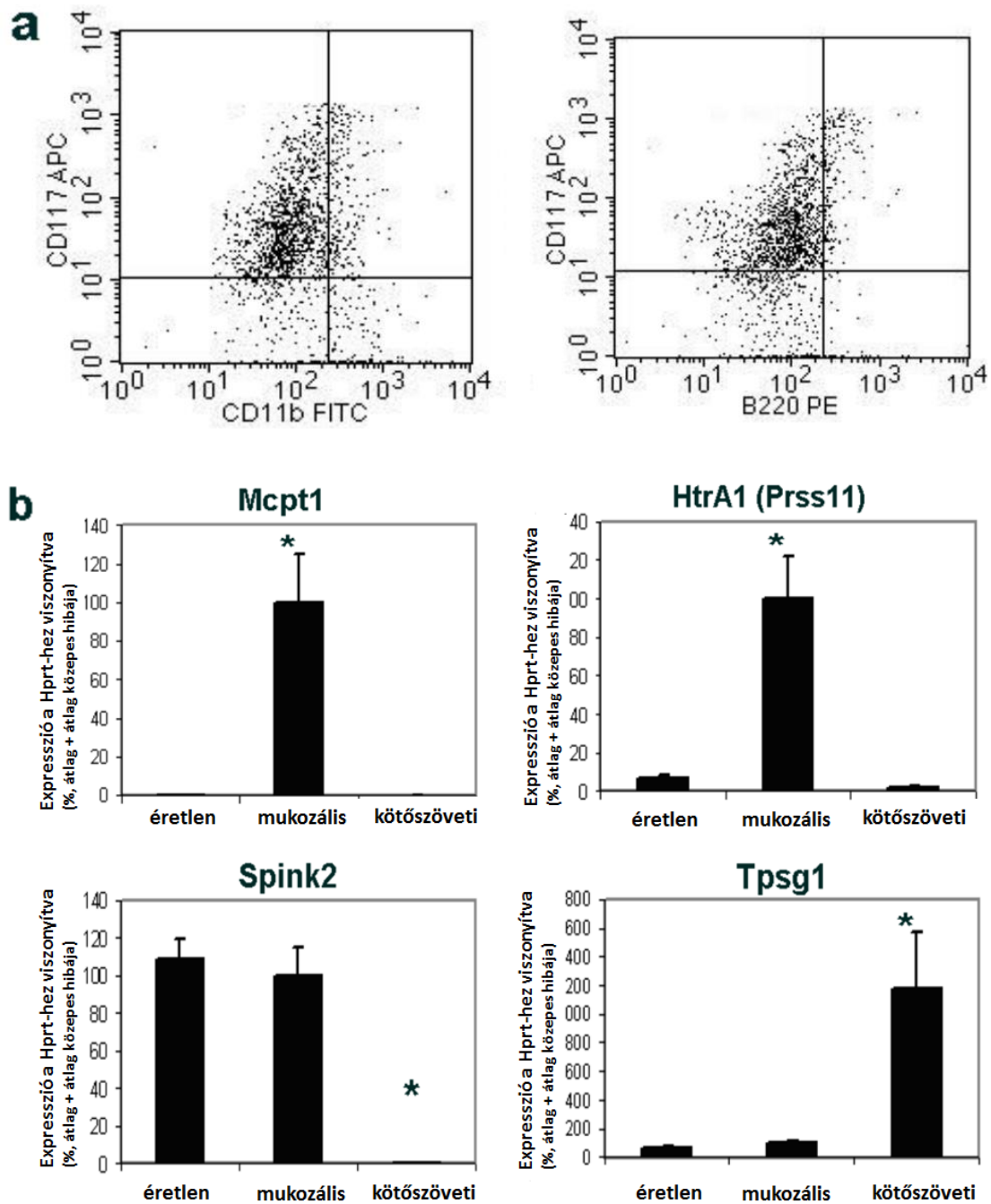
a) c-kit expresszió növekedése figyelhető meg a differenciálódás során (áramlási citometria; sima vonal: 4 napos, vastag vonal: 20 napos, pontozott vonal: izotípus kontroll). (b) A 20 napos sejtkultúrában magasabb Mcpt1 expressziót tapasztaltunk real-time PCR módszerrel ($n=4$, t-teszt: $p=0,015$. A 4 napos sejtkultúrában mért expressziós szintet vettük 100%-nak.) (c) Az IL-9 és a TGFβ1 csökkenti a hízósejtek c-kit expresszióját (áramlási citometria; sima vonal: IL-3 és SCF jelenlétében differenciáltatott kontroll sejtek, vastag vonal: IL-3, SCF, IL-9 és TGFβ1 jelenlétében differenciáltatott sejtek, pontozott vonal: izotípus kontroll). (d) A mukozális hízósejtek érésének bemutatása a megemelkedett Mcpt1 expresszió által (real-time PCR, $n=4$, t-teszt: $p=0,01$). Az IL-3 és SCF jelenlétében fenntartott sejtkultúrák (éretlen hízósejtek) expresszióját tekintettük 100%-nak.

5.2 A mukozális hízósejtek érése során különbözőképpen expresszáldó proteáz és proteáz-inhibitor gének kiválasztása

Annak érdekében, hogy rátaláljunk azon génekre, amelyek expressziója megváltozik a mukozális hízósejtek differenciálódása során, a 4 és 20 napos minták kétsatornás micorarray kísérletben összehasonlításra kerültek. A kapott adatok közül a $p < 0,05$ szinten (Benjamini-Hochberg-féle hamis elfogadási arány alapján) több, mint 2-szeres upregulációban részesült géneket szűrtük ki. Mivel a hízósejtek gazdag forrásai különböző proteázoknak, a 240 szignifikánsan upregulálódott gén közül kiválasztottuk a proteázokat és proteáz-inhibitorokat. Ahogy az várható volt, a lista számos jól ismert, hízósejt-specifikus proteáz gént tartalmazott (*Mcpt5*, *Mcpt6*, *Mcpt1*), valamint olyanokat is, melyek funkciója még kevésbé ismert (triptáz-gamma 1, másnéven transzmembrán-triptáz). Sőt, olyan proteáz, illetve proteáz-inhibitor géneket is azonosítani tudtunk, melyek hízósejtekben való előfordulása korábban még nem volt ismert. A microarray eredményeket *Prss11* (*HtrA1*), *Spink2*, *Tpsg1*, *Mcpt6* és *Mcpt1* esetében real-time PCR módszerrel validáltuk.

5.3 A HtrA1 (Prss11) az érett mukozális hízósejtekre nézve specifikusnak bizonyult

A kiválasztott proteázok és proteáz-inhibitorok expressziójának mértékét megvizsgáltuk éretlen és érett mukozális hízósejtekben, illetve a különböző hízósejt-populációkban. Kísérleteink során az érett mukozális hízósejteket IL-3, SCF, IL-9 és TGF β I jelenlétében differenciáltattuk, míg az éretlen hízósejtek IL-9 és TGF β I hiányában nőttek, a kötőszöveti hízósejteket pedig a peritóneumból izoláltuk. Tukey HSD post hoc teszttel a következő szignifikáns különbségek látszottak az adott csoportok között: *Spink2*-re éretlen-kötőszöveti ($p=0,0008$), mukozális-kötőszöveti ($p=0,0017$), *Tpsg1*-re éretlen-kötőszöveti ($p=0,0026$), mukozális-kötőszöveti ($p=0,003$), *Prss11*-re éretlen-mukozális ($p=0,00036$), mukozális-kötőszöveti ($p=0,00042$), *Mcpt1*-re éretlen-mukozális ($p=0,002$) és mukozális-kötőszöveti ($p=0,003$). (6. ábra) A kiválasztott proteáz, illetve proteáz-inhibitor gének közül a HtrA1 specifikusnak bizonyult az érett mukozális hízósejtekre nézve.

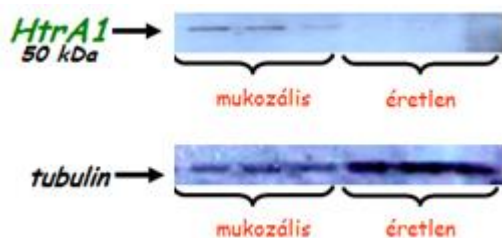


6. ábra. A HtrA1 a mukozális hízósejtek specifikus proteáza.

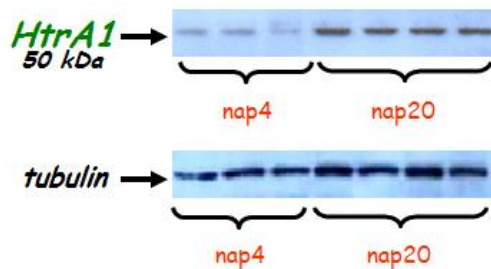
(a) A peritoneális hízósejt-preparátumokat áramlási citometriával ellenőriztük, ahol CD11b-re (monocita-marker) és B220-ra (B-sejtekre jellemző) nézve negatívnak, c-kitre pedig pozitívnak bizonyultak. (b) A kiválasztott proteázok közül a HtrA1 specifikusnak tűnt a mukozális hízósejtekre nézve. Az Mcpt1 pozitív kontrollként szolgált. (real-time PCR, $n=4$, az érett mukozális hízósejtek átlagexpresszióját vettük 100%-nak). Egyszempontos ANOVA szerint $p<0,002$ mind a 4 vizsgált génre nézve.

Mivel az mRNS-szinten mért változások nem mindig felelnek meg a protein-szinten tapasztalt változásokkal, ezért a HtrA1 expressziót Western-blottal is megvizsgáltuk. A 7.a ábra szerint a HtrA1 fehérje nem bizonyult detektálhatónak az éretlen mukozális hízósejtekben (melyek csak IL-3 és SCF jelenlétében differenciálódtak), 20 napos sejtkultúrában. Továbbá, a 20. napon izolált érett mukozális hízósejt kultúrában magasabb Prss11 fehérje expressziót tapasztaltunk, mint az éretlen, 4 napos sejtkultúrában (7.b ábra). Sikert tehát a microarray eredményeket fehérjeszinten is igazolnunk.

(a)



(b)

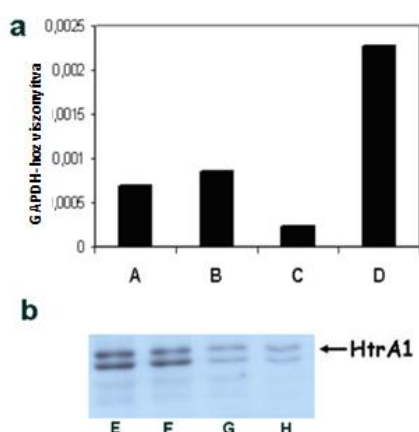


7. ábra. A HtrA1-re vonatkozó eredmények igazolása fehérjeszinten Western-blottal.

(a) Csak az egér érett mukozális (IL-3, SCF, IL-9, TGFβ1 jelenlétében differenciáltatott) hízósejtek expresszálnak HtrA1-et, az éretlen mukozális (IL-3 és SCF jelenlétében tenyésztett) hízósejtek nem. (b) A mukozális hízósejtek differenciálódása során a HtrA1 expressziója megnövekszik. Az IL-3, SCF, IL-9 és TGFβ1 citokineket tartalmazó sejtkultúrából a 4. és a 20. napon vett mintákkal dolgoztunk.

5.4 Humán triptáz-típusú hízósejtek is expresszálnak a HtrA1-et

Mivel számos publikációban utalnak az egér és a humán rendszer közti különbségekre, mi is megvizsgáltuk a HtrA1 jelenlétét humán rendszerben. Köldökvér-eredetű hízósejtek toluidinkékkel metakromatikusan festődnek 6 hetes sejt kultúrában, triptáz-pozitívak, kimázt viszont nem tartalmaznak, melyek a humán triptáz-típusú hízósejtekre jellemző tulajdonságok. A triptáz-típusú hízósejteknek tűnő sejtek a HTRA1-et különböző mértékben, de folyamatosan termelik (8.a és b ábra). Úgy találtuk továbbá, hogy számos más proteázzal ellentétben a HTRA1 nem a szekréciós granulumokban képződik.



8. ábra. A humán triptáz típusú hízósejtek HtrA1-et expresszálnak.

(a) real-time PCR (b) Western-blottolás. A többsoros csíkok a HtrA1 természetes degradációs termékeiből adódnak. A betűk különböző hízósejt preparátumokat jelölnek.

5.5 A HtrA1 konstitutíven szabadul fel humán hízósejtekből

A HTRA1 nem a szekréciós granulumokban lokalizálódik, hanem e fehérjét (az MCPT1 kimázhoz hasonlóan) konstitutív módon szecernálják a hízósejtek. Ezt a kijelentést azon ELISA kísérleteinkre alapozzuk, melyek során kezeletlen, illetve Ca-ionofór (ionomycin) anyag által kezelt triptáz típusú hízósejt tenyészetek felülúszóiban HTRA1-tartalom tekintetében nem találtunk különbséget. A kezelt sejt kultúrák esetén tapasztalható magasabb hisztamintermelés révén igazoltuk ugyanakkor az ionomycin degranulációt kiváltó hatását (1. táblázat).

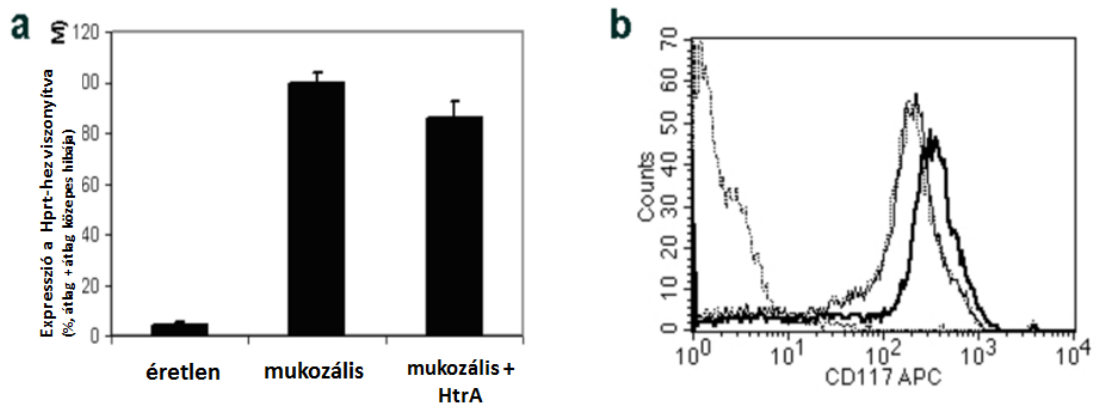
1. táblázat. Míg a hisztamin-koncentráció (Student-féle t-teszt, $p < 0,001$) megnövekszik, a HtrA1-koncentráció szintje nem emelkedik meg az ionomycin-kezelt humán hízósejtekben

(0,5 $\mu\text{g/ml}$, 30 perc, 1×10^6 sejt/ml).

	HtrA1-koncentráció (ng/ml)	Hisztamin-koncentráció (mM)
kontroll	2.8 ± 0.48	122 ± 21
ionomycin-kezelt	2.0 ± 0.39	1209 ± 329

5.6 A HtrA1 nem befolyásolja a TGF β általi egér mukozális hízósejt differenciálódást

Génexpressziós adataink „ingenuity pathway analízise” szerint a *HtrA1* két útvonal-hálózat része. Az egyik hálózat apoptózissal, illetve rákkal kapcsolatos géneket tartalmaz, a másik csoportba a sejtes/kötőszövetes fejlődésben és funkcióban, vagy a szkeletális és muszkuláris rendszer fejlődésében szereplő gének tartoznak. A kapott adatok szerint a *HtrA1* csak két másik génnel lép közvetlen kapcsolatba: az egyik a *Tgfb1*, a másik a szintén a TGF β -családba tartozó *Bmp4*. Továbbá, a HtrA1 TGF β -gátló hatását is leírták már.[194] Ennek alapján megvizsgáltuk, hogy a HtrA1-nek van-e TGF β -gátló hatása a mukozális sejtek differenciálódására nézve. Kétféle HtrA1-koncentrációt alkalmaztunk: 5 ng/ml-t, az általunk humán hízósejt felülúszókban mért HtrA1-koncentráció alapján, és 50 ng/ml-t, egy publikáció alapján.[195] Meglepetésünkre, a HtrA1 nem változtatta meg sem az Mcpt1-, sem a sejtfelszíni c-kit expresszió mértékét, az általunk használt modellrendszerben tehát nem sikerült kimutatnunk TGF β -gátló képességét az egér mukozális hízósejtek differenciálódása esetében (9. a és b ábrák).

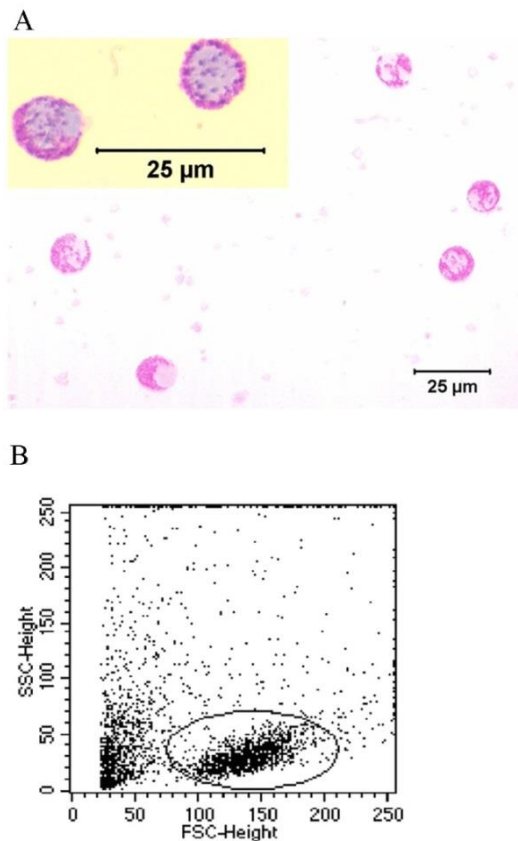


9. ábra. A HtrA1 nem gátolja a TGF β I-indukált egér mukozális hízósejt differenciálódást.

A sejteket IL-3, SCF és TGF β I, valamint 5 vagy 50 ng/ml HtrA1 jelenlétében tenyésztettük 20 napig (a tápot minden nap cseréltük). Az éretlen hízósejt-kultúrákból a TGF β I-et kihagytuk. Csak az 50 ng/ml HtrA1-tartalmú adatokat mutatjuk be. (a) Real-time PCR (n=4, az érett mukozális hízósejtek expresszióját vettük 100%-nak). (b) Áramlási citométerrel nem tudtunk kimutatni HtrA1-kezelés hatására c-kit expresszió növekedést (sima vonal: mukozális hízósejtek, pontozott vonal: HtrA1-kezelt hízósejtek), vastagított vonal: TGF β I hiányában tenyésztett éretlen sejtek. A másik pontozott vonal az izotípus-kontrollt jelöli).

5.7 Az izolált bazofilok tisztasága

A perifériás vérből izolált humán bazofil populáció közel teljesen homogénnek (99%-osnál tisztábbnak) bizonyult (10. ábra).

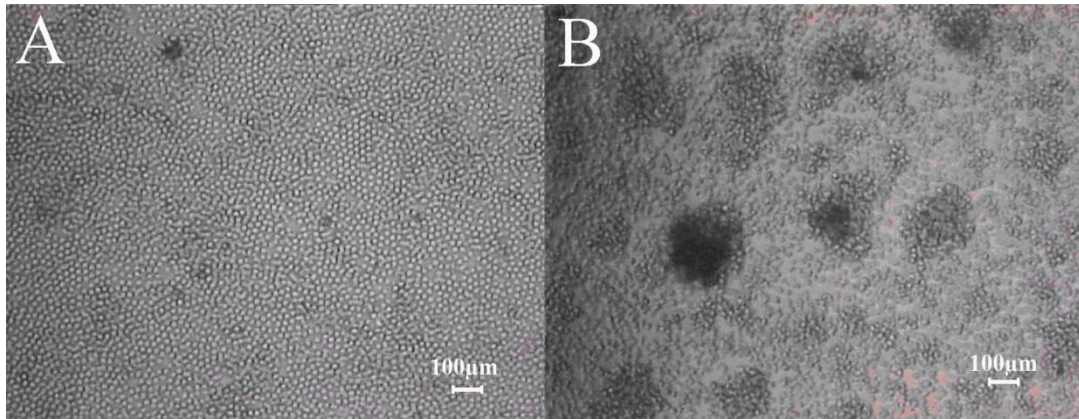


10. ábra. Az izolált humán bazofil granulocita populáció tisztaságának igazolása.

(a) A humán bazofil granulociták nagyfokú tisztaságának igazolása May-Grünwald festéssel (b) és áramlási citométerrel, FSC vs. SSC dot-plot alapján.

5.8 Az IL-3-kezelés hatása a bazofil sejtenyészetekre

A 11. a és b ábrán látható a hIL-3-mal való 100 perces kezelés hatása a humán bazofil granulociták sejt kultúrában való viselkedésére. A sejtek jellegzetes csoportosulása figyelhető meg a hIL-3-at tartalmazó sejt kultúrában, miközben a kontroll sejt kultúrában egyedi, lekerekített, különálló sejtek láthatóak.

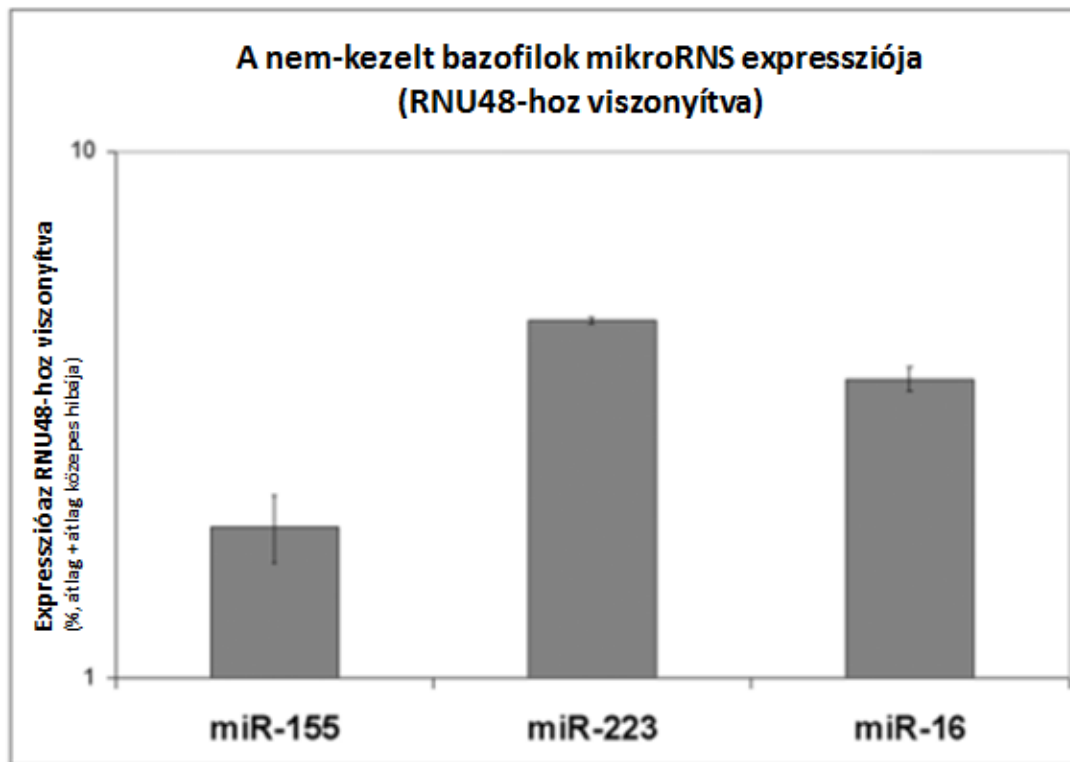


11. ábra. hIL-3 jelenlétében a humán bazofilok tenyésztésében kis sejtsomók alakulnak ki 100 perces kezelés során

(a) hIL3 nélkül homogén sejtkultúrában, lekerekített sejtek láthatóak, míg (b) 10 ng/ml hIL3-jelenlétében a humán bazofilok sejtsomókat formálnak.

5.9 miRNS-expresszió humán bazofilokban

A 12-es ábra (reprezentatív minta) szemlélteti, hogy a kezeletlen bazofilok miR-223-at, miR-155-öt és miR16-ot expresszálnak. A miR-223 és a miR-155 esetében ismert, hogy a granulociták differenciálódásának szabályozásában jelentősek [160, 178], míg a miR-16 magas szinten expresszálódik minden natív hematopoietikus sejtvonalban, valamint sokféle szövetben[196, 197]. Mind a miR-16, mind a miR-223 esetén magas szintű, míg a miR-155 esetén alacsonyabb, de jellemző expressziót tapasztaltunk egészséges humán bazofil mintákban.



12. ábra. A miR-155, a miR-223 és a miR-16 expressziója egészséges humán vöradókából származó humán bazofil granulocitákban.

RNU48-

**GATGACCCAGGTAAGTCTGAGTGTGTCGCTGATGCCATCACCGCAGC
GCTCTGACC** (Life Technologies)-ra standardizálv. (reprezentatív minta)

5.10 A hIL-3 hatása a bazofilok miRNS expressziójára

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a hIL-3 kezelés hatását a bazofilok miR-223, miR-155 és miR-16 expressziójára nézve, real-time PCR méréseket végeztünk. Mindhárom vizsgált mikroRNS esetében csökkent miRNS-expressziót tapasztaltunk hIL-3 kezelés következtében. A legmarkánsabb különbséget a miR-223 esetében találtuk, amit a miR-155, majd a miR-16 követett. A hIL-3-kezelt minták expressziós változásait a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat. A hIL-3 hatása a humán bazofilok mikroRNS-expressziójára

mikroRNS	kezeletlen	IL-3*	P
miR-155	1,37	1,084	<0.05
miR-223	4,02	3,47	<0.01
miR-16	3,17	3,01	N.sz.

*10 ng/ml hIL-3, 100 perc, n=15

N.sz. = Nem szignifikáns

5.11 A detektált miRNS-ek target predikciós és útvonal-analízissel kapott eredményei

A DIANA-mirPath szoftver által használt 5 algoritmus közül legalább 3-ban szerepelt az „FcεRI szignalizációs útvonal”, valamint a ‘Hisztidin metabolizmus útvonal’ is, mely útvonalak számos bazofil granulocita funkcióval is kapcsolatba hozhatóak.

6 AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A hízósejtek és a bazofil granulociták az allergiás, ill. a gyulladásos immunválaszban betöltött effektor szerepük révén váltak ismertté, azóta azonban jelentőségük számos egyéb immunfolyamatban is beigazolódott, így például a bakteriális- illetve a feregfertőzéssel szembeni immunválaszban. Emellett több tanulmány olvasható a hízósejtek tumoros szövetekben betöltött szerepével kapcsolatban, a bazofilok jelentősége pedig a mieloid leukémiás kórképekben ismert. A bazofilok érintettségét azonban nem lehet kizárni más rákos megbetegedések esetén sem. Igaz ugyan, hogy eddig kevés ismerettel rendelkezünk erről a sejttípusról a többi leukocitával összehasonlítva, ennek azonban több oka is van. Vizsgálatuk számos nehézségbe ütközött/ütközik, továbbá a hízósejtekkel való hasonlóságuk és a szervezetben kis mennyiségben való előfordulásuk miatt a bazofil granulociták hosszú ideig rendszerint nem kerültek a kutatások középpontjába, s így számos immunfolyamatban kevésbé ismerhettük meg meg a bazofilok jelentőségét.

Munkánk során a hízósejtek és a bazofil granulociták génexpressziós tulajdonságait vizsgáltuk, melynek során olyan eredményekre jutottunk, amelyek hozzájárulnak ezen sejttípusok tumoros folyamatokban való részvételének alaposabb megismeréséhez.

6.1 A mukozális hízósejtek újonnan kimutatott és specifikus szerin-proteáza a HtrA1

Egér mukozális hízósejtek csontvelőből való *in vitro* differenciáltatása során a tenyészetből a 4. napon izolált éretlen, de elkötelezett hízósejt prekurzorokat összehasonlítottuk a 20 napos tenyészetből izolált érett mukozális hízósejtekkel, kétsatornás microarray módszerrel. Tekintettel a hízósejt-proteázok jelentőségére, a kapott adatok felhasználásával olyan proteáz, illetve proteáz-

inhibitor gének kiválasztását céloztuk meg, amelyek a mukozális hízósejtekre jellemzőek és specifikusak.

Számos ismert hízósejt-proteáz (*Mcpt1*, -5, -6) expressziója emelkedett meg a differenciálódás során, többek között az *Mcpt1*-é, ami az egér mukozális hízósejtek jellemző proteáza. A 20 napos érett mukozális hízósejtekben szignifikánsan emelkedett *Mcpt1* expressziós szint egyúttal arra is utal, hogy sikeresen differenciáltattunk érett egér mukozális hízósejteket.

Találtunk azonban néhány, funkcionálisan kevésbé ismert proteázt, illetve proteáz-inhibítort is, köztük olyanokat, amelyek hízósejtekben való előfordulása még nem volt ismert.

A *Tpsg1* (triptáz-gamma 1) egy olyan, a hízósejtek szekréciós granulumaiban lokalizálódó transzmembrán triptázt kódol, mely IgE/antigén stimulusra a plazmamembránba kerül át, s ilyenformán képes elősegíteni az IL-4- és/vagy IL-13-függő légúti hiperérzékenységet.[198] Egy proteáz-inhibitor gén, a *Spink-2/HUSI-II* (akrozin-tripszin inhibitor, szerin-proteáz inhibitor 2-es Kazal-típus) szintén emelkedett expressziót mutatott a differenciálódás során. Erről a génről ismert, hogy a nemi szervekben expresszálódik és gátolja az akrozint és a tripszint. A *HtrA1/Prss11* -amely egy extracellulárisan szecernált, multidoménos szerin-proteáz - szintén szerepelt a differenciálódás során markánsan upregulálódó gének között.

Ezt követően összehasonlítottuk ezen proteázok és proteáz-inhibitorok expresszióját a különböző hízósejt-típusokban. Míg a *Tpsg1* a kötőszöveti hízósejtek jellemző proteázának bizonyult, addig a *HtrA1* gén expressziója csak a mukozális hízósejtekre volt jellemző, tehát a mukozális hízósejtek specifikus proteázának tekinthető.

A *HtrA1*-ről számos esetben írták le, hogy humán szolid tumorokban downregulálódik. Túlexpressziója gátolja a sejtnövekedést és –proliferációt humán ráksejtekben. A *HtrA1* tumorszupresszor szerepét feltételezik melanómában[199], ovárium-tumorokban[200], endometriális rákban[201], hepatocelluláris karcinómában[202], mellrákban[203], tüdőrákban[204] és

meningiómában[205]. A HtrA1-et továbbá összefüggésbe hozták már nyelőcsőrakkal[206], pajzsmirigyakkal[207], urotheliális húgyhólyagrakkal[208], humán mesotheliomával[209] és gyomorrakkal[210] is.

Osteoarthritisben és rheumatoid arthritisben a HtrA1 stimulálja az Mmp3 expressziót a szinoviális fibroblasztokban[195], így hat közvetlenül a mátrix metalloproteáz expresszióra, közvetve pedig azáltal, hogy megköti az olyan extracelluláris fehérjéket, mint amilyen a fibronektin. Az extracelluláris fehérjék megkötését követően a megnövekedett számban jelen levő kisebb fragmentumok stimulálják vagy gátolják a különböző sejtfunkciókat, ahogy ez a kis fibronektin fragmentumok esetén bebizonyosodott[211, 212].

Kimutatták azt is, hogy segítheti az ízületi porc-degeneráció folyamatát.[213] Olvashatunk a HtrA1 csont-morfogenezisben és csontfejlődésben betöltött szerepéről[214, 215], vagy arról hogy az asztrociták is szecernálnak HtrA1-et[216].

A HtrA1 számos extracelluláris targetjét azonosították, köztük a fibrilláris prokollagén I, II, III-as típusának C-propeptidjét[217], a fibronektint[195], vagy a proteoglikánok közül az aggregánt[214]. Mindezek alapján a HtrA1 feltételezhetően fontos szerepet tölt be az extracelluláris mátrix átrendeződés folyamataiban.

A HtrA1 a vérerek falának homeosztázisában is jelentős szerepet játszik. A proteáz- és proteáz-inhibitor komplexek endocitózisának szabályozását végző LRP1 (LDL-receptorral összefüggésben álló protein 1) molekula a HtrA1-szint változtatásának segítségével képes a vérerek szerkezeti integritásának szabályozására. [218] Úgy tűnik továbbá, hogy a HtrA1 kritikus jelentőségű az angiogenezisben is.[219, 220]

Tudjuk, hogy a HtrA1 gén egy, az 5' végen található szignál peptid szekvenciát kódol, a fehérjetermék pontos lokalizációjáról azonban csak ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. Néhány forrás szerint a HtrA1 citoplazmatikus fehérje, [199, 200] és a kemoterápia-indukált apoptózisban jelentős.[221] Számos más közleményben ugyanakkor arra utalnak, hogy a HtrA1 az extracelluláris térbe

szecernálódik és a hatását ott fejt ki. Sőt, egy tanulmányban arról számolnak be, hogy a HtrA1 feldolgozott formája nem csak intracellulárisan, hanem intranukleárisan is megtalálható.[222]

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a humán triptáz-típusú hízósejtek is expresszálnak HTRA1-et. Érdekes módon azonban, vizsgálataink alapján ez a proteáz fehérje nem a szekréciós granulumokban található meg, továbbá expressziója folyamatos és a degranulációtól független. Kísérleteink arra utalnak, hogy a HTRA1 hízósejtek esetén extracellulárisan lokalizálódik, ugyanakkor nem zárható ki, hogy hatását intracellulárisan is képes kifejteni.

Annak ellenére, hogy a HtrA1-et számos szövetben leírták már[223, 224], a fehérje különböző szövetekben betöltött pontos funkciója eleddig ismeretlen. A HtrA-család legismertebb tagja a HtrA2, melyről azt feltételezik, hogy kettős szerepe van a sejtben: normál fiziológiás körülmények között a mitokondriális homeosztázis fenntartásához szükséges, míg apoptózis esetén a mitokondriumokból szabadul fel.[225] A HtrA2-höz hasonlóan a HtrA1 is szerepet játszik az apoptózisban[221]. Más források TGF β -gátló aktivitásáról írnak[194, 215], mely kimondottan a fehérje funkcionális szerin-proteáz aktivitásától függ. Az adatainkkal végzett Ingenuity Pathway Analysis-sal nekünk is sikerült kimutatnunk közvetlen kapcsolatot a HtrA1 és a TGF- β I között. Azonban nem sikerült igazolnunk, hogy a HtrA1 gátolná a mukozális hízósejt differenciálódást, továbbá HtrA1-kezelés hatására nem tapasztaltunk változást sem az Mcpt1, sem a c-kit expressziós szintben. Bár a kísérleteinkhez rekombináns humán HtrA1-et használtunk, az egér és humán HtrA1 magas aminosav-azonosságát (több, mint 90%-os) figyelembe véve, mely különösen a szerin-proteáz doménben kifejezett (161 aminosavban csak 2 különböző), meglehetősen valószínűtlen hogy az általunk használt HtrA1 ne legyen kompatibilis az egér szervezettel.

Összefoglalva tehát, kimutattuk a HtrA1-et, mint az egér mukozális- és az emberi triptáz-típusú hízósejtek új proteázát, és igazoltuk a humán triptáz-típusú hízósejtek konstitutív HTRA1 szekrécióját. Bár e fehérje pontos funkciója még nem ismert, a mi adataink szerint legalábbis nem gátolja a TGF β -indukált

mukozális hízósejt differenciálódást, de szerepe lehet a hízósejtek által szabályozott szöveti átrendeződéses folyamatokban.

6.2 A mieloid sejtek mikroRNS expressziója

A leukociták megismerésére végzett génexpressziós vizsgálatok már nem korlátozódnak pusztán a DNS fehérjekódoló szakaszainak génexpressziós tanulmányozására, hanem a nem fehérjekódoló régiókról átíródó, így a kisméretű RNS-ek közé tartozó mikroRNS-ek működését is egyre kiterjedtebben elemzik. Ez a sejten belüli génregulációs folyamatok komplexitásának megismerésében egy új perspektívát jelent, és az ezzel kapcsolatos vizsgálatok ugrásszerű fejlődést is hoztak a tumor-immunológiai kutatásokba. A mikroRNS-ek bizonyítottan jelentősek tumor onkogénként vagy -szupresszorként a sejtttranszformációban és – sokszorozódásban, negatív hatásuk egyértelműen hozzájárul számos rákbetegség fejlődéséhez és patofiziológiájához, így felmerül a mikroRNS-ek felhasználhatóságának kérdése a rákterápiában. Másik fő funkciója a mikroRNS-eknek - mint az antitumor-immunitás fontos szabályozó folyamataiban kritikus regulátor elemeknek – hogy befolyásolni képesek a különböző természetes és adaptív immunrendszerhez tartozó immunsejtek fejlődését, differenciálódását és aktivációját.

Újabban egyre több adat áll rendelkezésre a különböző immunsejtek mikroRNS-expressziós mintázatára vonatkozólag. Egy számos immunsejttípust vizsgáló microarray tanulmány szerint több mikroRNS található a mieloid, mint a limfoid sejt típusokban. Noha ez csupán néhány mikroRNS-t jelent relatíve alacsony számban, mégis szignifikáns másodlagos hatást válthatnak ki ezek a mikroRNS-ek más gének transzkripciójára nézve azáltal, hogy direkt módon represszálják a transláció szabályozásában résztvevő gének expresszállódását.[177] A mieloid sejtek mikroRNS-mintázatát tekintve, a legtöbbet a neutrofilokról és a monocitákról tudunk, néhány adat elérhető a mieloid dendritikus sejtekről, ám eozinofilok és hízósejtek esetén meglehetősen kevés ilyen irányú információ ismert (intézetünkben korábban történt egy jelentős mikroRNS-vizsgálat hízósejteken [226]), bazofilokról pedig egyelőre nem található ebben a témában

publikáció. Mi a hízósejtek, valamint a többi mieloid sejt: monociták, neutrofilok, eozinofilek miRNS-expressziójáról összegyűjtött adatok alapján megkíséreltünk egy áttekintőbb képet alkotni a mieloid sejtek mikroRNS mintázatáról, hogy saját bazofil-mikroRNS expressziós eredményeinket beilleszthessük az eddigi információk adta keretek közé. Csak minimálisan érintettük a mieloid dendritikus sejteket, mivel mikroRNS-expressziójuk meglehetősen eltérő a többiétől, s nem tértünk ki az újonnan felfedezett mieloid eredetű szupresszor sejtek tulajdonságaira sem.

Néhány, az immunsejtek mikroRNS-mintázatát feltérképező mikroRNS microarray alapú publikáció már elérhető. Az egyikben, amelyben 9 leukocita-típus (köztük a neutrofilok, eozinofilek, monociták, és mieloid dendritikus sejtek) miRNS profiljáról számolnak be, a szerzők a következő mikroRNS-eket találták mieloid-specifikusnak: miR-223, miR-143, miR-145, miR-25, miR-27, miR-425, miR-17, miR-652 és miR-191. Ugyanezen sejtekkel egy másik mikroRNS-array kísérletet is végeztek, melyben azt vizsgálták, hogy az adott sejtípus-specifikus mikroRNS-ek downregulálják-e a target génjük expresszióját. Azt találták, hogy az ABL2 nonreceptor tirozin-kináz - mely a sejt differenciálódás, sejtosztódás és sejtadhézió folyamataiban szabályozza a citoszkeleton újrendeződését – targetje a legtöbb mieloid-specifikus mikroRNS-nek. Ezen mikroRNS-ek tehát az ABL2 represszálása által elősegíthetik a differenciálódást és granulopoiesist, mivel képesek a differenciálatlan mieloid prekursor állapot fenntartását megakadályozni.[177] Egy másik mikroRNS-microarray tanulmányban megvizsgálták a mikroRNS-ek befolyását a neutrofil génexpresszióra nézve, fizikai megterhelést követően. Minden, az fizikai megterhelés által befolyásolt neutrofil mikroRNS-ről (beleértve a miR-17-et, miR-18a-t, a miR-20-at és a miR-17-92-t, aminek csökkent az expressziós szintje a megterhelés után) tudjuk, hogy szerepet játszik az immunfolyamatokban és az apoptózisban. A miR-223 esetében az megterhelést követően azonnal megemelkedett expressziót mértek. A szerzők 3 olyan fő szignalizációs útvonalat találtak neutrofilokban, amelyekben a fizikai megterhelés által befolyásolt mikroRNS-ek és mRNS-ek egyaránt szerepet játszanak: az ubiquitin-szabályozott proteolízis útvonalat, a JAK-STAT- és a hedgehog-szignalizációs útvonalat. Ezen útvonalak mindegyike kulcsjelentőségű

a gyulladás mechanizmusában.[227] Egy másik, frissen izolált humán neutrofileket vizsgáló microarray tanulmányban azt találták, hogy minden általuk vizsgált mintában, minden időpontban a miR-223 expressziója volt a legmarkánsabb.[161] Ami a hízósejteket illeti, egyetlen egér hízósejt microarray kísérlet ismert, amelyben csontvelői eredetű hízósejtek differenciálódása és aktivációja során jellemző mikroRNS-változásokat elemeztek. Az eredmények azt mutatták, hogy a miR-132 upregulációja a legmagasabb IgE/antigén keresztkötést követően, mely miRNS transzlációs szinten a HB-EGF expresszióját szabályozza. A miR-132 expresszióját humán köldökvér-eredetű hízósejteken is igazolták.[226] Monociták, dendritikus sejtek és makrofágok mikroRNS-mintázatát is vizsgálták microarray-jel, ahol a miR-511-et, a miR-99b-t és a miR-212-t találták a három legmagasabban expresszálandó mikroRNS-nek mind dendritikus sejtekben, mind makrofágokban. Azt is megállapították, hogy mikroRNS-mintázat tekintetében a monociták jobban hasonlítanak a makrofágokhoz, mint a dendritikus sejtekhez, az elvégzett hierarchikus klaszter-analízis tükrében. A sejt differenciálódás során a miR-146a és a miR-132 voltak azok, melyek legmarkánsabban változtak.[228]

Az említett microarray kísérletek mieloid sejtjeinek mikroRNS-mintázatára vonatkozó adatokat összegyűjtöttük egy táblázatban (3. táblázat).

3. táblázat. A mieloid sejtek már publikált mikroRNS-ei.

(Mo: monocyte, Neu: neutrophil, Eo: eosinophil, Muc MC: mucosal mast cell, DC: dendritic cell; h: human, m: murine, saját er.: saját eredmény. A zárójelben található számok a megfelelő hivatkozásra utalnak.)

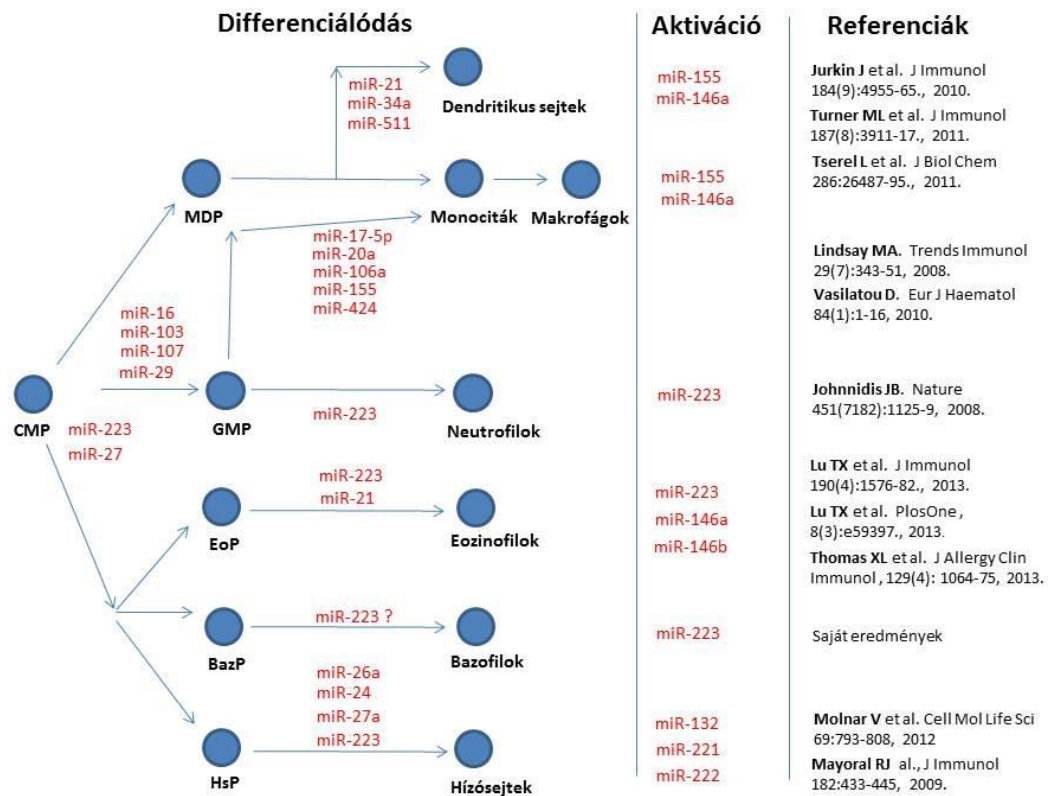
	Mo	Neu	Eo	Bas	muc. MCs	DCs
mir-17	h(177)	h(161)				
mir-21		h(161)			m(226)	
mir-25		h(177), h(161)	h(177)			
mir-24-1*					m(226)	
mir-24-2*					m(226)	
mir-27a	h(177)	h(177), h(161)	h(177)		m(226)	
mir-34a		h(161)			m(226)	h(228)
mir-93	h(177)	h(177), h(161)	h(177)			

mir-99a						h(228)
mir-99b						h(228)
mir-106a	h(177)					
mir-106b	h(177)	h(177), h(161)	h(177)			
mir-125a-5p		h(177)				h(228)
mir-125a-3p					m(226)	
mir-125b						h(228)
mir-132					m(226)	h(228)
mir-143		h(177)				
mir-145		h(177)				
mir-146a						h(228)
mir-155				saját er.		h(228)
mir-191	h(177)	h(177)	h(177)			
mir-193b					m(226)	h(228)
mir-212						h(228)
mir-223	h(177)	h(177), h(161)	h(177)	saját er.		
mir-362-5p	h(177)					h(177)
mir-362-3p					m(226)	
mir-378	h(177)					
mir-422a	h(177)					
mir-425	h(177)	h(177), h(161)	h(177)			
mir-494					m(226)	
mir-500-star	h(177)				m(226)	h(177)
mir-511						h(228)
mir-532-5p	h(177)				m(226)	h(177)
mir-652	h(177)	h(177)	h(177)		m(226)	
mir-720		h(161)				
mir-935			h(177)			

A táblázatból látszik, hogy 2 mikroRNS (a miR-27a és a miR-652) a mieloid sejtek közös mikroRNS-ének tűnik, mivel a táblázatban megjelenített mieloid

sejttípusok közül legalább négyben expresszáldtak. Hízósejtek esetében az irodalomban egyedül egérből származó microarray adatok álltak a rendelkezésünkre. Ezek közül azon mikroRNS-eket jelenítettük meg a 2. táblázatban, amelyek szignifikánsan upregulálódtak a hízósejt-differenciálódás során, vagy az FcεRI keresztükötése által aktiválódtak. A mir-223 szignifikánsan downregulálódott a hízósejt-differenciálódás során. Egy korábbi tanulmányban szintén kimutatták a miR-27a expresszióját érett egér csontvelői hízósejtekben. [229] Az jól ismert, hogy a miR-223 kulcsszerepet játszik a mieloid fejlődésben és funkcióban (1. ábra), a miR-27a és a miR-652 esetében viszont erről nincs információnk, sőt, elmondható hogy meglehetősen kevés ismerettel rendelkezünk ezen két mikroRNS-ről. Saját eredményeink igazolták a mir-223 expresszióját humán bazofilokban is. IL-3-kezelés hatására a miR-223, a miR-16 és a miR-155 expressziója downregulálódott *in vitro*. A mikroRNS-eknek, mint a transzláció inhibitorainak ilyen módon megfigyelt redukciója, összefüggésben áll azzal a jól ismert jelenséggel, hogy az IL-3 a bazofilokra stimulációs hatással bír.

Az immunsejtek differenciálódásában jelentős mikroRNS-eket a 13. ábrában foglaltunk össze.



13. ábra. A mieloid fejlődési irány mikroRNS általi szabályozottságának áttekintő vázlata.

(CMP: common myeloid progenitor, MDP: makrofág/dendritikus sejt progenitor, GMP: granulocita/monocita progenitor, EoP: eozinofil progenitor, BazP: bazofil progenitor, HsP: hízósejt progenitor)

Számos tanulmányban számolnak be arról, hogy az abnormális miRNS-expresszió különböző humán megbetegedések gyakori kísérőjelensége, s azon betegségek száma is egyre növekszik, amelyekben a mikroRNS-ek szerepe igazolt. Sőt, néhány tumortípus esetén a keringésben kimutatható mikroRNS-ek potenciális prognosztikus markerek lehetnek.

A gyulladás-indukált tumorigenezis működésének feltárása, valamint új terápiás targetek azonosítása érdekében, a gyulladásos és rákos folyamatok kulcs-mikroRNS-einek további vizsgálata célravezető stratégia lehet. MiR-155 esetében leírták hogy a miR-155 és a miR-155-tel kapcsolatos proinflammatorikus környezet mutációs aktivitással bír, és szerepet játszik a gyulladás-okozta

rákokban.[230] Elképzelhető, hogy a miR-146a a hiányzó kapocs a gyulladás és a tumorigenezis között, mivel egyre növekvő számban olvashatóak publikációk, amelyek a miR-146a jelentőségéről számolnak be mind a gyulladásos megbetegedésekben, mind a tumorokban. Mivel a mikroRNS-ek és transzkripciós faktorok komplex hálózatokat alkotnak, a mieloid vonal fejlődési és differenciációs útvonalának szabályozása meglehetősen összetett. Ezek a vonal-specifikus pozitív és negatív szabályozó hurkok. Ezen hurkok által a mikroRNS-ek képesek szabályozni a normális hematopoietikus fejlődést. Továbbá, ezek egyensúlyának megbillenése vagy zavara a rendellenes expresszió által betegségeket idéz elő.[167]

Egyelőre a monociták, a hízósejtek, az eozinofilok és a bazofilok miRNS-mintázatairól és –hálózatáról korlátozottak az irodalomban fellelhető információk, az azonban bizonyos hogy a gyulladás és fertőzés a malignanciákra befolyással van. A mieloid biológia és patofiziológia ezen területeinek behatóbb ismerete jelentős eredményekkel kecsegtet.

Az irodalomban fellelhető csekély számú mieloid mikroRNS eredmény ellenére, a meglévő publikációk alapján megállapítható hogy a kulcsfontosságú miR-223 mellett a miR-27a és a miR-652 és más mikroRNS-ek is jelentős szabályozói lehetnek a mieloid folyamatoknak, így a jövőben potenciális terápiás célpontokká válhatnak.

7 KÖVETKEZTETÉSEK

- A differenciáltatott egér mukozális hízósejteken végzett microarray-kísérletből kiindulva, gén- és fehérjeszinten is kimutattunk egy, az egér mukozális és az ember triptáz-típusú hízósejtjeire jellemző szerin-proteázt, a HtrA1-et.
- Igazoltuk, hogy a *HtrA1* nem csak jellemző, hanem specifikus is a mukozális hízósejtekre, hiszen az egerben található másik hízósejttípusban, a kötőszöveti hízósejtekben csak igen mérsékelt expresszióját tapasztaltuk.
- Bár irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a HtrA1 gátolja a Tgf β -szignalizációs útvonalat, kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a HtrA1 nincs hatással a Tgf β -indukált hízósejt differenciálódásra, de feltételezéseink szerint szerepe lehet a hízósejtek által indukált szöveti átrendeződéses folyamatokban.
- Az irodalomban elsőként azonosítottunk bazofilokban expresszáldó mikroRNS-eket. Kimutattuk bazofilokban a miR-223, a miR-16 és a miR-155 expresszióját. A legerősebb expressziót a miR-223 esetében tapasztaltuk, amely a mieloid differenciálódás szabályozásának kulcsfontosságú mikroRNS-e és számos rákos megbetegedéssel kapcsolatba hozták már.
- Kimutattuk, hogy ezen mikroRNS-ek a bazofilok differenciálódásához és aktivációjához túléléséhez szükséges IL-3 hatására downregulálódtak.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

Bár régóta jól ismert, hogy a krónikus gyulladások és különböző ráktípusok kialakulásának helyszíne gyakran megegyező, a gyulladás tumorigenezisben való kritikus jelentősége csak az utóbbi évtizedben vált nyilvánvalóvá. A gyulladásos mikrokörnyezet nélkülözhetetlen tényezője minden ráknak, ahol a tumorsejtek és a gyulladásos sejtek egymással együttműködve a tumorfejlődésnek és a metasztázisnak kedvező mikrokörnyezetet hoznak létre. Mostanára az is bebizonyosodott, hogy a bakteriális és virális eredetű gyulladás megnöveli a rák valószínűségét. Tehát, a gyulladásos sejtek vizsgálata jó stratégia lehet ezen kapcsolat jobb megismerése érdekében.

Mi olyan új gének kimutatását kíséreltük meg, amelyek expressziója a mukozális hízósejtek differenciálódása során erősen megnövekedett. Így detektáltuk microarray kísérletek alapján a HtrA1 szerin proteázt, mint új hízósejt fehérjét. A HtrA1 a mukozális hízósejtekre specifikusnak bizonyult, minthogy egér mukozális hízósejtekben szignifikánsan magasabb az expressziója, mint kötőszöveti hízósejtekben. Továbbá, a HtrA1 nem a szekréciós granulumokban lokalizálódik, és a hízósejtek konstitutív módon szecernálják. Mivel a HtrA1-nek számos extracelluláris target fehérjéje létezik, ez a proteáz szerepet játszhat a hízósejt-indukálta extracelluláris átrendeződésben.

A gyulladás-indukálta tumorigenezis működésének megértése érdekében a gyulladásban és rákban szereplő kulcs mikroRNS-ek azonosítása és további vizsgálata szintén hasznos stratégia lehet. Ennek során, humán perifériás vérből származó bazofilokban azonosítottuk a miR-223, a miR-155 és a miR-16 kifejeződését, és ezek expressziójának IL-3 hatásra történő downregulációját. A miR-223 - amely esszenciális és központi jelentőségű szabályozója a mieloid differenciálódásnak és emberben kontrollálja a granulocita differenciálódást - mutatta a legmagasabb expressziót és IL-3 hatására a legkifejezettebb csökkenést humán bazofilokban.

Tehát, új információkkal szolgáltunk a hízósejtek és a bazofilok, mint klasszikus gyulladásos sejtek, néhány tumorról kapcsolatos tulajdonságáról, ezzel hozzájárulva a gyulladás-tumor kapcsolat feltárásához, s ezáltal a jövőben új terápiák kidolgozásához.

9 SUMMARY

It was only recently proven that inflammation plays a critical role in tumorigenesis. Inflammatory microenvironment is an essential component of all tumors, where tumor cells and inflammatory cells come to cooperate and form a tumor microenvironment that facilitates the tumor development and metastasis. Moreover, it is now well-established that the induction of inflammation by bacterial and viral infections increases cancer risk. Therefore, examination of inflammatory cells could be a useful strategy in order to have a better knowledge about this relationship.

In an attempt to identify novel genes that are highly upregulated during mucosal mast cell differentiation, we detected HtrA1 serine protease as a novel protein in mast cells by microarray experiments. HtrA1 seemed to be specific of mucosal mast cells as its expression was much higher in murine mucosal than in connective tissue-type mast cells. Furthermore, HtrA1 is not localized in the secretory granules and is constitutively secreted by human mast cells. As many extracellular target proteins have been suggested for HtrA1, this protease may participate in the mast cell-induced extracellular remodeling.

In order to find out how inflammation-induced tumorigenesis works, identification and further investigation of key miRNAs involved in inflammation and cancer, were our strategy. We identified miR-223, miR-155 and miR-16 expression in human peripheral blood basophils, and their expression was downregulated after IL-3 treatment. miR-223, which is an essential and central modulator of myeloid differentiation and may control granulocytic differentiation in humans, showed the highest expression and the most pronounced decrease in response to IL-3, in human basophils.

As we presented novel informations about some tumor-related features of the classical inflammatory cell types mast cells and basophils, our results may contribute the understanding of inflammation-tumor relationship, and hereby be useful in development of new therapies in the future.

10 IRODALOMJEGYZÉK

1. Galli, S.J., Tsai, M., and Piliponsky, A.M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature* 454, 445-454.
2. Ohnmacht, C., and Voehringer, D. (2009). Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. *Blood* 113, 2816-2825.
3. Dahlin, J.S., and Hallgren, J. (2015). Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. *Mol Immunol* 63, 9-17.
4. Buhning, H.J., Simmons, P.J., Pudney, M., Muller, R., Jarrossay, D., van Agthoven, A., Willheim, M., Brugger, W., Valent, P., and Kanz, L. (1999). The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 94, 2343-2356.
5. Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M.F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D.G., Austen, K.F., and Akashi, K. (2005). Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18105-18110.
6. Qi, X., Hong, J., Chaves, L., Zhuang, Y., Chen, Y., Wang, D., Chabon, J., Graham, B., Ohmori, K., Li, Y., and Huang, H. (2013). Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBPalpha and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity* 39, 97-110.
7. Gauvreau, G.M., and Denburg, J.A. (2015). Human mast cell and basophil/eosinophil progenitors. *Methods Mol Biol* 1220, 59-68.
8. Arock, M., Schneider, E., Boissan, M., Tricottet, V., and Dy, M. (2002). Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions. *J Leukoc Biol* 71, 557-564.
9. Saito, H., Matsumoto, K., Okumura, S., Kashiwakura, J., Oboki, K., Yokoi, H., Kambe, N., Ohta, K., and Okayama, Y. (2006). Gene expression profiling of human mast cell subtypes: an in silico study. *Allergol Int* 55, 173-179.
10. Min, B. (2010). Mice that "conditionally" lack basophils, AT LAST. *J Clin Invest* 120, 2648-2651.
11. Denzel, A., Maus, U.A., Rodriguez Gomez, M., Moll, C., Niedermeier, M., Winter, C., Maus, R., Hollingshead, S., Briles, D.E., Kunz-Schughart, L.A.,

- Talke, Y., and Mack, M. (2008). Basophils enhance immunological memory responses. *Nat Immunol* 9, 733-742.
12. Chapuy, L., Bsai, M., Mehta, H., Rubio, M., Wakahara, K., Van, V.Q., Baba, N., Cheong, C., Yun, T.J., Panzini, B., Wassef, R., Richard, C., Tamaz, R., Soucy, G., Delespesse, G., and Sarfati, M. (2014). Basophils increase in Crohn disease and ulcerative colitis and favor mesenteric lymph node memory TH17/TH1 response. *J Allergy Clin Immunol* 134, 978-981 e971.
 13. Yamaguchi, M., Lantz, C.S., Oettgen, H.C., Katona, I.M., Fleming, T., Miyajima, I., Kinet, J.P., and Galli, S.J. (1997). IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med* 185, 663-672.
 14. Kinet, J.P. (1999). The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 17, 931-972.
 15. Cambier, J.C. (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 155, 3281-3285.
 16. Sandig, H., and Bulfone-Paus, S. (2012). TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Front Immunol* 3, 185.
 17. Migalovich-Sheikhet, H., Friedman, S., Mankuta, D., and Levi-Schaffer, F. (2012). Novel identified receptors on mast cells. *Front Immunol* 3, 238.
 18. Andrasfalvy, M., Prechl, J., Hardy, T., Erdei, A., and Bajtai, Z. (2002). Mucosal type mast cells express complement receptor type 2 (CD21). *Immunol Lett* 82, 29-34.
 19. Schafer, B., Piliponsky, A.M., Oka, T., Song, C.H., Gerard, N.P., Gerard, C., Tsai, M., Kalesnikoff, J., and Galli, S.J. (2013). Mast cell anaphylatoxin receptor expression can enhance IgE-dependent skin inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 131, 541-548 e541-549.
 20. Boyce, J.A., Mellor, E.A., Perkins, B., Lim, Y.C., and Luscinskas, F.W. (2002). Human mast cell progenitors use alpha4-integrin, VCAM-1, and PSGL-1 E-selectin for adhesive interactions with human vascular endothelium under flow conditions. *Blood* 99, 2890-2896.

21. Vincent-Schneider, H., Thery, C., Mazzeo, D., Tenza, D., Raposo, G., and Bonnerot, C. (2001). Secretory granules of mast cells accumulate mature and immature MHC class II molecules. *J Cell Sci* 114, 323-334.
22. Galli, S.J., Tsai, M., and Wershil, B.K. (1993). The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am J Pathol* 142, 965-974.
23. Moller, C., Alfredsson, J., Engstrom, M., Wootz, H., Xiang, Z., Lennartsson, J., Jonsson, J.I., and Nilsson, G. (2005). Stem cell factor promotes mast cell survival via inactivation of FOXO3a-mediated transcriptional induction and MEK-regulated phosphorylation of the proapoptotic protein Bim. *Blood* 106, 1330-1336.
24. Meininger, C.J., Yano, H., Rottapel, R., Bernstein, A., Zsebo, K.M., and Zetter, B.R. (1992). The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* 79, 958-963.
25. Taylor, A.M., Galli, S.J., and Coleman, J.W. (1995). Stem-cell factor, the kit ligand, induces direct degranulation of rat peritoneal mast cells in vitro and in vivo: dependence of the in vitro effect on period of culture and comparisons of stem-cell factor with other mast cell-activating agents. *Immunology* 86, 427-433.
26. Galli, S.J., Iemura, A., Garlick, D.S., Gamba-Vitalo, C., Zsebo, K.M., and Andrews, R.G. (1993). Reversible expansion of primate mast cell populations in vivo by stem cell factor. *J Clin Invest* 91, 148-152.
27. Wiener, Z., Kohalmi, B., Pocza, P., Jeager, J., Tolgyesi, G., Toth, S., Gorbe, E., Papp, Z., and Falus, A. (2007). TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells. *J Invest Dermatol* 127, 906-914.
28. Irie, A., Yamauchi, A., Kontani, K., Kihara, M., Liu, D., Shirato, Y., Seki, M., Nishi, N., Nakamura, T., Yokomise, H., and Hirashima, M. (2005). Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Clin Cancer Res* 11, 2962-2968.
29. Kageshita, T., Kashio, Y., Yamauchi, A., Seki, M., Abedin, M.J., Nishi, N., Shoji, H., Nakamura, T., Ono, T., and Hirashima, M. (2002). Possible role of

- galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int J Cancer* 99, 809-816.
30. Nobumoto, A., Oomizu, S., Arikawa, T., Katoh, S., Nagahara, K., Miyake, M., Nishi, N., Takeshita, K., Niki, T., Yamauchi, A., and Hirashima, M. (2009). Galectin-9 expands unique macrophages exhibiting plasmacytoid dendritic cell-like phenotypes that activate NK cells in tumor-bearing mice. *Clin Immunol* 130, 322-330.
 31. Nagahara, K., Arikawa, T., Oomizu, S., Kontani, K., Nobumoto, A., Tateno, H., Watanabe, K., Niki, T., Katoh, S., Miyake, M., Nagahata, S., Hirabayashi, J., Kuchroo, V.K., Yamauchi, A., and Hirashima, M. (2008). Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8+ T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *J Immunol* 181, 7660-7669.
 32. Kojima, R., Ohno, T., Iikura, M., Niki, T., Hirashima, M., Iwaya, K., Tsuda, H., Nonoyama, S., Matsuda, A., Saito, H., Matsumoto, K., and Nakae, S. (2014). Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line. *PLoS One* 9, e86106.
 33. Pejler, G., Ronnberg, E., Waern, I., and Wernersson, S. (2010). Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 115, 4981-4990.
 34. Scudamore, C.L., McMillan, L., Thornton, E.M., Wright, S.H., Newlands, G.F., and Miller, H.R. (1997). Mast cell heterogeneity in the gastrointestinal tract: variable expression of mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) in intraepithelial mucosal mast cells in nematode-infected and normal BALB/c mice. *Am J Pathol* 150, 1661-1672.
 35. Pemberton, A.D., Brown, J.K., Wright, S.H., Knight, P.A., McPhee, M.L., McEuen, A.R., Forse, P.A., and Miller, H.R. (2003). Purification and characterization of mouse mast cell proteinase-2 and the differential expression and release of mouse mast cell proteinase-1 and -2 in vivo. *Clin Exp Allergy* 33, 1005-1012.
 36. Ha, T.Y., Reed, N.D., and Crowle, P.K. (1983). Delayed expulsion of adult *Trichinella spiralis* by mast cell-deficient W/W^v mice. *Infect Immun* 41, 445-447.

37. Kamiya, M., Oku, Y., Itayama, H., and Ohbayashi, M. (1985). Prolonged expulsion of adult *Trichinella spiralis* and eosinophil infiltration in mast cell-deficient W/W^v mice. *J Helminthol* 59, 233-239.
38. Knight, P.A., Wright, S.H., Lawrence, C.E., Paterson, Y.Y., and Miller, H.R. (2000). Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J Exp Med* 192, 1849-1856.
39. Miller, H.R., Wright, S.H., Knight, P.A., and Thornton, E.M. (1999). A novel function for transforming growth factor-beta1: upregulation of the expression and the IgE-independent extracellular release of a mucosal mast cell granule-specific beta-chymase, mouse mast cell protease-1. *Blood* 93, 3473-3486.
40. Schwartz, L.B. (2006). Analysis of MC(T) and MC(TC) mast cells in tissue. *Methods Mol Biol* 315, 53-62.
41. Ronnberg, E., Calounova, G., Guss, B., Lundequist, A., and Pejler, G. (2013). Granzyme D is a novel murine mast cell protease that is highly induced by multiple pathways of mast cell activation. *Infect Immun* 81, 2085-2094.
42. Ronnberg, E., Calounova, G., Sutton, V.R., Trapani, J.A., Rollman, O., Hagforsen, E., and Pejler, G. (2014). Granzyme H is a novel protease expressed by human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 165, 68-74.
43. Proud, D., Siekierski, E.S., and Bailey, G.S. (1988). Identification of human lung mast cell kininogenase as tryptase and relevance of tryptase kininogenase activity. *Biochem Pharmacol* 37, 1473-1480.
44. Huang, C., Wong, G.W., Ghildyal, N., Gurish, M.F., Sali, A., Matsumoto, R., Qiu, W.T., and Stevens, R.L. (1997). The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity in vivo and in vitro due to its ability to degrade fibrinogen in the presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma. *J Biol Chem* 272, 31885-31893.
45. Kielty, C.M., Lees, M., Shuttleworth, C.A., and Woolley, D. (1993). Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: susceptibility to degradation by serine proteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 191, 1230-1236.
46. Fajardo, I., and Pejler, G. (2003). Human mast cell beta-tryptase is a gelatinase. *J Immunol* 171, 1493-1499.

47. Kofford, M.W., Schwartz, L.B., Schechter, N.M., Yager, D.R., Diegelmann, R.F., and Graham, M.F. (1997). Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. *J Biol Chem* 272, 7127-7131.
48. Berger, P., Perng, D.W., Thabrew, H., Compton, S.J., Cairns, J.A., McEuen, A.R., Marthan, R., Tunon De Lara, J.M., and Walls, A.F. (2001). Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* (1985) 91, 1372-1379.
49. Ammendola, M., Leporini, C., Marech, I., Gadaleta, C.D., Scognamillo, G., Sacco, R., Sammarco, G., De Sarro, G., Russo, E., and Ranieri, G. (2014). Targeting mast cells tryptase in tumor microenvironment: a potential antiangiogenetic strategy. *Biomed Res Int* 2014, 154702.
50. Ribatti, D., and Ranieri, G. (2015). Tryptase, a novel angiogenic factor stored in mast cell granules. *Exp Cell Res* 332, 157-162.
51. Miller, H.R., and Pemberton, A.D. (2002). Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology* 105, 375-390.
52. Barnes, P.J., Chung, K.F., and Page, C.P. (1988). Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol Rev* 40, 49-84.
53. Rabenstein, D.L., Bratt, P., and Peng, J. (1998). Quantitative characterization of the binding of histamine by heparin. *Biochemistry* 37, 14121-14127.
54. Laszlo, V., Rothe, G., Orso, E., Falus, A., and Schmitz, G. (2000). Possible role of histidine decarboxylase (HDC) and histamine in human in vitro monocyte-macrophage differentiation. *Inflamm Res* 49 Suppl 1, S64-65.
55. Dunford, P.J., O'Donnell, N., Riley, J.P., Williams, K.N., Karlsson, L., and Thurmond, R.L. (2006). The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *J Immunol* 176, 7062-7070.
56. Garcia-Caballero, M., Neugebauer, E., Rodriguez, F., Nunez de Castro, I., and Vara-Thorbeck, C. (1994). Histamine synthesis and content in benign and malignant breast tumours. Its effects on other host tissues. *Surg Oncol* 3, 167-173.

57. Falus, A., Hegyesi, H., Lazar-Molnar, E., Pos, Z., Laszlo, V., and Darvas, Z. (2001). Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. *Trends Immunol* 22, 648-652.
58. Reynolds, J.L., Akhter, J., Adams, W.J., and Morris, D.L. (1997). Histamine content in colorectal cancer. Are there sufficient levels of histamine to affect lymphocyte function? *Eur J Surg Oncol* 23, 224-227.
59. Hegyesi, H., Somlai, B., Varga, V.L., Toth, G., Kovacs, P., Molnar, E.L., Laszlo, V., Karpati, S., Rivera, E., Falus, A., and Darvas, Z. (2001). Suppression of melanoma cell proliferation by histidine decarboxylase specific antisense oligonucleotides. *J Invest Dermatol* 117, 151-153.
60. von Mach-Szczypinski, J., Stanosz, S., Sieja, K., and Stanosz, M. (2009). Metabolism of histamine in tissues of primary ductal breast cancer. *Metabolism* 58, 867-870.
61. Marone, G., Triggiani, M., and de Paulis, A. (2005). Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? *Trends Immunol* 26, 25-31.
62. Pos, Z., Safrany, G., Muller, K., Toth, S., Falus, A., and Hegyesi, H. (2005). Phenotypic profiling of engineered mouse melanomas with manipulated histamine production identifies histamine H2 receptor and rho-C as histamine-regulated melanoma progression markers. *Cancer Res* 65, 4458-4466.
63. Melgarejo, E., Medina, M.A., Paz, J.C., Sanchez-Jimenez, F., and Urdiales, J.L. (2006). Real-time RT-PCR analysis of human histidine decarboxylase, a new marker for several types of leukemia and cancer. *Oncol Rep* 15, 193-197.
64. Norrby, K. (1995). Evidence of a dual role of endogenous histamine in angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 76, 87-92.
65. Fraser, R.A., and Simpson, J.G. (1983). Role of mast cells in experimental tumour angiogenesis. *Ciba Found Symp* 100, 120-131.
66. Prevete, N., Staiano, R.I., Granata, F., Detoraki, A., Necchi, V., Ricci, V., Triggiani, M., De Paulis, A., Marone, G., and Genovese, A. (2013). Expression and function of Angiopoietins and their tie receptors in human basophils and mast cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 27, 827-839.
67. Martin, R.K., Saleem, S.J., Folgosa, L., Zellner, H.B., Damle, S.R., Nguyen, G.K., Ryan, J.J., Bear, H.D., Irani, A.M., and Conrad, D.H. (2014). Mast cell

- histamine promotes the immunoregulatory activity of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* 96, 151-159.
68. Basso, D., Fogar, P., Falconi, M., Fadi, E., Sperti, C., Frasson, C., Greco, E., Tamburrino, D., Teolato, S., Moz, S., Bozzato, D., Pelloso, M., Padoan, A., De Franchis, G., Gnatta, E., Facco, M., Zambon, C.F., Navaglia, F., Pasquali, C., Basso, G., Semenzato, G., Pedrazzoli, S., Pederzoli, P., and Plebani, M. (2013). Pancreatic tumors and immature immunosuppressive myeloid cells in blood and spleen: role of inhibitory co-stimulatory molecules PDL1 and CTLA4. An in vivo and in vitro study. *PLoS One* 8, e54824.
 69. Jiao, Z.J., Gao, J.J., Hua, S.H., Chen, D.Y., Wang, W.H., Wang, H., Wang, X.H., and Xu, H.X. (2012). Correlation between circulating myeloid-derived suppressor cells and Th17 cells in esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 18, 5454-5461.
 70. Sun, H.L., Zhou, X., Xue, Y.F., Wang, K., Shen, Y.F., Mao, J.J., Guo, H.F., and Miao, Z.N. (2012). Increased frequency and clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 18, 3303-3309.
 71. Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., and Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 58, 49-59.
 72. Oschatz, C., Maas, C., Lecher, B., Jansen, T., Bjorkqvist, J., Tradler, T., Sedlmeier, R., Burfeind, P., Cichon, S., Hammerschmidt, S., Muller-Esterl, W., Willemin, W.A., Nilsson, G., and Renne, T. (2011). Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. *Immunity* 34, 258-268.
 73. Taildeman, J., Perez-Novo, C.A., Rottiers, I., Ferdinande, L., Waeytens, A., De Colvenaer, V., Bachert, C., Demetter, P., Waelput, W., Braet, K., and Cuvelier, C.A. (2009). Human mast cells express leptin and leptin receptors. *Histochem Cell Biol* 131, 703-711.

74. Jain, S., Harris, J., and Ware, J. (2010). Platelets: linking hemostasis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2362-2367.
75. Lewis, R.A., Soter, N.A., Diamond, P.T., Austen, K.F., Oates, J.A., and Roberts, L.J., 2nd (1982). Prostaglandin D₂ generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *J Immunol* 129, 1627-1631.
76. Weller, C.L., Collington, S.J., Brown, J.K., Miller, H.R., Al-Kashi, A., Clark, P., Jose, P.J., Hartnell, A., and Williams, T.J. (2005). Leukotriene B₄, an activation product of mast cells, is a chemoattractant for their progenitors. *J Exp Med* 201, 1961-1971.
77. Ringvall, M., Ronnberg, E., Wernersson, S., Duelli, A., Henningsson, F., Abrink, M., Garcia-Faroldi, G., Fajardo, I., and Pejler, G. (2008). Serotonin and histamine storage in mast cell secretory granules is dependent on serglycin proteoglycan. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1020-1026.
78. Kushnir-Sukhov, N.M., Brown, J.M., Wu, Y., Kirshenbaum, A., and Metcalfe, D.D. (2007). Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. *J Allergy Clin Immunol* 119, 498-499.
79. Del Prete, A., Allavena, P., Santoro, G., Fumarulo, R., Corsi, M.M., and Mantovani, A. (2011). Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Biochem Med (Zagreb)* 21, 264-275.
80. Ishii, T., Wang, J., Zhang, W., Mascarenhas, J., Hoffman, R., Dai, Y., Wisch, N., and Xu, M. (2009). Pivotal role of mast cells in pruritogenesis in patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 113, 5942-5950.
81. Okayama, Y., Okumura, S., Sagara, H., Yuki, K., Sasaki, T., Watanabe, N., Fueki, M., Sugiyama, K., Takeda, K., Fukuda, T., Saito, H., and Ra, C. (2009). FcεRI-mediated thymic stromal lymphopoietin production by interleukin-4-primed human mast cells. *Eur Respir J* 34, 425-435.
82. Lo Kuan, E., and Ziegler, S.F. (2014). Thymic stromal lymphopoietin and cancer. *J Immunol* 193, 4283-4288.
83. Williams, C.M., and Galli, S.J. (2000). The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 105, 847-859.

84. Singh, S., Singh, A.P., Sharma, B., Owen, L.B., and Singh, R.K. (2010). CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis. *Future Oncol* 6, 111-116.
85. Moon, T.C., Befus, A.D., and Kulka, M. (2014). Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Front Immunol* 5, 569.
86. Grutzkau, A., Kruger-Krasagakes, S., Baumeister, H., Schwarz, C., Kogel, H., Welker, P., Lippert, U., Henz, B.M., and Moller, A. (1998). Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell* 9, 875-884.
87. Abdel-Majid, R.M., and Marshall, J.S. (2004). Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *J Immunol* 172, 1227-1236.
88. Norrby, K. (2002). Mast cells and angiogenesis. *APMIS* 110, 355-371.
89. Kankkunen, J.P., Harvima, I.T., and Naukkarinen, A. (1997). Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *Int J Cancer* 72, 385-388.
90. Esposito, I., Kleeff, J., Bischoff, S.C., Fischer, L., Collecchi, P., Iorio, M., Bevilacqua, G., Buchler, M.W., and Friess, H. (2002). The stem cell factor-c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer. *Lab Invest* 82, 1481-1492.
91. Esposito, I., Menicagli, M., Funel, N., Bergmann, F., Boggi, U., Mosca, F., Bevilacqua, G., and Campani, D. (2004). Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 57, 630-636.
92. Takanami, I., Takeuchi, K., and Naruke, M. (2000). Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 88, 2686-2692.
93. Yano, H., Kinuta, M., Tateishi, H., Nakano, Y., Matsui, S., Monden, T., Okamura, J., Sakai, M., and Okamoto, S. (1999). Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. *Gastric Cancer* 2, 26-32.

94. Bischoff, S.C. (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol* 7, 93-104.
95. Hoyle, C.F., Sherrington, P.D., Fischer, P., and Hayhoe, F.G. (1989). Basophils in acute myeloid leukaemia. *J Clin Pathol* 42, 785-792.
96. Min, B., Prout, M., Hu-Li, J., Zhu, J., Jankovic, D., Morgan, E.S., Urban, J.F., Jr., Dvorak, A.M., Finkelman, F.D., LeGros, G., and Paul, W.E. (2004). Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med* 200, 507-517.
97. Meknache, N., Jonsson, F., Laurent, J., Guinneeain, M.T., and Daeron, M. (2009). Human basophils express the glycosylphosphatidylinositol-anchored low-affinity IgG receptor FcgammaRIIB (CD16B). *J Immunol* 182, 2542-2550.
98. Bieneman, A.P., Chichester, K.L., Chen, Y.H., and Schroeder, J.T. (2005). Toll-like receptor 2 ligands activate human basophils for both IgE-dependent and IgE-independent secretion. *J Allergy Clin Immunol* 115, 295-301.
99. Komiya, A., Nagase, H., Okugawa, S., Ota, Y., Suzukawa, M., Kawakami, A., Sekiya, T., Matsushima, K., Ohta, K., Hirai, K., Yamamoto, K., and Yamaguchi, M. (2006). Expression and function of toll-like receptors in human basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 140 Suppl 1, 23-27.
100. de Paulis, A., Florio, G., Prevete, N., Triggiani, M., Fiorentino, I., Genovese, A., and Marone, G. (2002). HIV-1 envelope gp41 peptides promote migration of human Fc epsilon RI+ cells and inhibit IL-13 synthesis through interaction with formyl peptide receptors. *J Immunol* 169, 4559-4567.
101. de Paulis, A., Prevete, N., Fiorentino, I., Walls, A.F., Curto, M., Petraroli, A., Castaldo, V., Ceppa, P., Fiocca, R., and Marone, G. (2004). Basophils infiltrate human gastric mucosa at sites of *Helicobacter pylori* infection, and exhibit chemotaxis in response to *H. pylori*-derived peptide Hp(2-20). *J Immunol* 172, 7734-7743.
102. Yamaguchi, M., Koketsu, R., Suzukawa, M., Kawakami, A., and Iikura, M. (2009). Human basophils and cytokines/chemokines. *Allergol Int* 58, 1-10.
103. Suzukawa, M., Iikura, M., Koketsu, R., Nagase, H., Tamura, C., Komiya, A., Nakae, S., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K., and Yamaguchi, M.

- (2008). An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol* *181*, 5981-5989.
104. de Paulis, A., Prevete, N., Fiorentino, I., Rossi, F.W., Staibano, S., Montuori, N., Ragno, P., Longobardi, A., Liccario, B., Genovese, A., Ribatti, D., Walls, A.F., and Marone, G. (2006). Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J Immunol* *177*, 7322-7331.
 105. Florian, S., Sonneck, K., Czerny, M., Hennersdorf, F., Hauswirth, A.W., Buhring, H.J., and Valent, P. (2006). Detection of novel leukocyte differentiation antigens on basophils and mast cells by HLDA8 antibodies. *Allergy* *61*, 1054-1062.
 106. Voskamp, A.L., Prickett, S.R., Mackay, F., Rolland, J.M., and O'Hehir, R.E. (2013). MHC class II expression in human basophils: induction and lack of functional significance. *PLoS One* *8*, e81777.
 107. Sharma, M., Hegde, P., Aimaniananda, V., Beau, R., Maddur, M.S., Senechal, H., Poncet, P., Latge, J.P., Kaveri, S.V., and Bayry, J. (2013). Circulating human basophils lack the features of professional antigen presenting cells. *Sci Rep* *3*, 1188.
 108. Sloane, D.E., Tedla, N., Awoniyi, M., Macglashan, D.W., Jr., Borges, L., Austen, K.F., and Arm, J.P. (2004). Leukocyte immunoglobulin-like receptors: novel innate receptors for human basophil activation and inhibition. *Blood* *104*, 2832-2839.
 109. Falcone, F.H., Zillikens, D., and Gibbs, B.F. (2006). The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. *Exp Dermatol* *15*, 855-864.
 110. Ebo, D.G., Sainte-Laudy, J., Bridts, C.H., Mertens, C.H., Hagendorens, M.M., Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S., and Stevens, W.J. (2006). Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* *61*, 1028-1039.
 111. Han, X., Jorgensen, J.L., Brahmandam, A., Schlette, E., Huh, Y.O., Shi, Y., Awagu, S., and Chen, W. (2008). Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med* *132*, 813-819.

112. Agis, H., Fureder, W., Bankl, H.C., Kundi, M., Sperr, W.R., Willheim, M., Boltz-Nitulescu, G., Butterfield, J.H., Kishi, K., Lechner, K., and Valent, P. (1996). Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology* 87, 535-543.
113. Toba, K., Koike, T., Shibata, A., Hashimoto, S., Takahashi, M., Masuko, M., Azegami, T., Takahashi, H., and Aizawa, Y. (1999). Novel technique for the direct flow cytometric analysis of human basophils in unseparated blood and bone marrow, and the characterization of phenotype and peroxidase of human basophils. *Cytometry* 35, 249-259.
114. Nguyen, K.L., Gillis, S., and MacGlashan, D.W., Jr. (1990). A comparative study of releasing and nonreleasing human basophils: nonreleasing basophils lack an early component of the signal transduction pathway that follows IgE cross-linking. *J Allergy Clin Immunol* 85, 1020-1029.
115. Yamaguchi, M., Hirai, K., Ohta, K., Suzuki, K., Kitani, S., Takaishi, T., Ito, K., Ra, C., and Morita, Y. (1996). Nonreleasing basophils convert to releasing basophils by culturing with IL-3. *J Allergy Clin Immunol* 97, 1279-1287.
116. Tschopp, C.M., Spiegl, N., Didichenko, S., Lutmann, W., Julius, P., Virchow, J.C., Hack, C.E., and Dahinden, C.A. (2006). Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. *Blood* 108, 2290-2299.
117. Dearman, R.J., Skinner, R.A., Deakin, N., Shaw, D., and Kimber, I. (2005). Evaluation of an in vitro method for the measurement of specific IgE antibody responses: the rat basophilic leukemia (RBL) cell assay. *Toxicology* 206, 195-205.
118. Gentile, D.A., and Skoner, D.P. (1996). A role for the sodium, potassium adenosine triphosphatase (Na⁺,K⁺ ATPase) enzyme in degranulation of rat basophilic leukaemia cells. *Clin Exp Allergy* 26, 1449-1460.
119. Gilmartin, L., Tarleton, C.A., Schuyler, M., Wilson, B.S., and Oliver, J.M. (2008). A comparison of inflammatory mediators released by basophils of asthmatic and control subjects in response to high-affinity IgE receptor aggregation. *Int Arch Allergy Immunol* 145, 182-192.

120. Jogie-Brahim, S., Min, H.K., Fukuoka, Y., Xia, H.Z., and Schwartz, L.B. (2004). Expression of alpha-tryptase and beta-tryptase by human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 113, 1086-1092.
121. Yamagishi, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Obata, K., Ugajin, T., Sato, S., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H. (2011). Basophil-derived mouse mast cell protease 11 induces microvascular leakage and tissue edema in a mast cell-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 415, 709-713.
122. Suzukawa, M., Komiya, A., Iikura, M., Nagase, H., Yoshimura-Uchiyama, C., Yamada, H., Kawasaki, H., Ohta, K., Matsushima, K., Hirai, K., Yamamoto, K., and Yamaguchi, M. (2006). Trans-basement membrane migration of human basophils: role of matrix metalloproteinase-9. *Int Immunol* 18, 1575-1583.
123. Kimata, M., Ishizaki, M., Tanaka, H., Nagai, H., and Inagaki, N. (2006). Production of matrix metalloproteinases in human cultured mast cells: involvement of protein kinase C-mitogen activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Allergol Int* 55, 67-76.
124. Mustafa, F.B., Ng, F.S., Nguyen, T.H., and Lim, L.H. (2008). Honeybee venom secretory phospholipase A2 induces leukotriene production but not histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol* 151, 94-100.
125. Falcone, F.H., Haas, H., and Gibbs, B.F. (2000). The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 96, 4028-4038.
126. Kurimoto, Y., de Weck, A.L., and Dahinden, C.A. (1989). Interleukin 3-dependent mediator release in basophils triggered by C5a. *J Exp Med* 170, 467-479.
127. Savari, S., Vinnakota, K., Zhang, Y., and Sjolander, A. (2014). Cysteinyl leukotrienes and their receptors: bridging inflammation and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 20, 968-977.
128. Wedemeyer, J., and Galli, S.J. (2000). Mast cells and basophils in acquired immunity. *Br Med Bull* 56, 936-955.
129. Lie, W.J., Homburg, C.H., Kuijpers, T.W., Knol, E.F., Mul, F.P., Roos, D., and Tool, A.T. (2003). Regulation and kinetics of platelet-activating factor and leukotriene C4 synthesis by activated human basophils. *Clin Exp Allergy* 33, 1125-1134.

130. van der Donk, E.M., Blok, W., Kok, P.T., and Bruijnzeel, P.L. (1991). Leukotriene C4 formation by enriched human basophil preparations from normal and asthmatic subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 44, 11-17.
131. Urban, J.F., Jr., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Madden, K.B., Morris, S.C., Collins, M., and Finkelman, F.D. (1998). IL-13, IL-4, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8, 255-264.
132. Voehringer, D., Shinkai, K., and Locksley, R.M. (2004). Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity* 20, 267-277.
133. Gibbs, B.F., Haas, H., Falcone, F.H., Albrecht, C., Vollrath, I.B., Noll, T., Wolff, H.H., and Amon, U. (1996). Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur J Immunol* 26, 2493-2498.
134. Nouri-Aria, K.T., Irani, A.M., Jacobson, M.R., O'Brien, F., Varga, E.M., Till, S.J., Durham, S.R., and Schwartz, L.B. (2001). Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen-induced late asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108, 205-211.
135. Devouassoux, G., Foster, B., Scott, L.M., Metcalfe, D.D., and Prussin, C. (1999). Frequency and characterization of antigen-specific IL-4- and IL-13-producing basophils and T cells in peripheral blood of healthy and asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 104, 811-819.
136. Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G., and Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 9, 310-318.
137. Ikeda, K., Nakajima, H., Suzuki, K., Kagami, S., Hirose, K., Suto, A., Saito, Y., and Iwamoto, I. (2003). Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* 101, 3594-3596.
138. Wang, Y.H., Angkasekwinai, P., Lu, N., Voo, K.S., Arima, K., Hanabuchi, S., Hippe, A., Corrigan, C.J., Dong, C., Homey, B., Yao, Z., Ying, S., Huston, D.P., and Liu, Y.J. (2007). IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing

- the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med* 204, 1837-1847.
139. Dong, C. (2008). Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol Rev* 226, 80-86.
 140. Schneider, E., Lemoine, F.M., Breton-Gorius, J., Machavoine, F., Arnould, A., Cramer, E.M., Guichard, J., and Michel, D. (1999). IL-3-induced coexpression of histidine decarboxylase, IL-4 and IL-6 mRNA by murine basophil precursors. *Exp Hematol* 27, 1010-1018.
 141. Sechet, B., Meseri-Delwail, A., Arock, M., Wijdenes, J., Lecron, J.C., and Sarrouilhe, D. (2003). Immunoglobulin D enhances interleukin-6 release from the KU812 human prebasophil cell line. *Gen Physiol Biophys* 22, 255-263.
 142. Higa, S., Hirano, T., Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Suemura, M., Kawase, I., and Tanaka, T. (2003). Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 111, 1299-1306.
 143. Yamaguchi, A., Gabazza, E.C., Takei, Y., Yano, Y., Fujimoto, H., D'Alessandro-Gabazza, C.N., Murakami, E., Kobayashi, T., Takagi, T., Maruyama, J., Suzuki, K., and Taguchi, O. (2008). Role of thrombin in interleukin-5 expression from basophils. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 116-120.
 144. Yanagihara, Y., Kajiwar, K., Basaki, Y., Ikizawa, K., Akiyama, K., and Saito, H. (1997). Induction of human IgE synthesis in B cells by a basophilic cell line, KU812. *Clin Exp Immunol* 108, 295-301.
 145. Yanagihara, Y., Kajiwar, K., Basaki, Y., Ikizawa, K., Ebisawa, M., Ra, C., Tachimoto, H., and Saito, H. (1998). Cultured basophils but not cultured mast cells induce human IgE synthesis in B cells after immunologic stimulation. *Clin Exp Immunol* 111, 136-143.
 146. Oh, K., Shen, T., Le Gros, G., and Min, B. (2007). Induction of Th2 type immunity in a mouse system reveals a novel immunoregulatory role of basophils. *Blood* 109, 2921-2927.

147. Schroeder, J.T., Chichester, K.L., and Bieneman, A.P. (2009). Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease. *J Immunol* 182, 2432-2438.
148. Kawakami, T. (2008). Basophils now enhance memory. *Nat Immunol* 9, 720-721.
149. Watanabe, M., Satoh, T., Yamamoto, Y., Kanai, Y., Karasuyama, H., and Yokozeki, H. (2008). Overproduction of IgE induces macrophage-derived chemokine (CCL22) secretion from basophils. *J Immunol* 181, 5653-5659.
150. Bishop, B., and Lloyd, C.M. (2003). CC chemokine ligand 1 promotes recruitment of eosinophils but not Th2 cells during the development of allergic airways disease. *J Immunol* 170, 4810-4817.
151. McEuen, A.R., Calafat, J., Compton, S.J., Easom, N.J., Buckley, M.G., Knol, E.F., and Walls, A.F. (2001). Mass, charge, and subcellular localization of a unique secretory product identified by the basophil-specific antibody BB1. *J Allergy Clin Immunol* 107, 842-848.
152. Kepley, C.L., Craig, S.S., and Schwartz, L.B. (1995). Identification and partial characterization of a unique marker for human basophils. *J Immunol* 154, 6548-6555.
153. Plager, D.A., Weiss, E.A., Kephart, G.M., Mocharla, R.M., Matsumoto, R., Checkel, J.L., Schwartz, L.B., Gleich, G.J., and Leiferman, K.M. (2006). Identification of basophils by a mAb directed against pro-major basic protein 1. *J Allergy Clin Immunol* 117, 626-634.
154. Mochizuki, A., McEuen, A.R., Buckley, M.G., and Walls, A.F. (2003). The release of basogranulin in response to IgE-dependent and IgE-independent stimuli: validity of basogranulin measurement as an indicator of basophil activation. *J Allergy Clin Immunol* 112, 102-108.
155. Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
156. Sonkoly, E., Stahle, M., and Pivarcsi, A. (2008). MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 18, 131-140.

157. Filkova, M., Aradi, B., Senolt, L., Ospelt, C., Vettori, S., Mann, H., Filer, A., Raza, K., Buckley, C.D., Snow, M., Vencovsky, J., Pavelka, K., Michel, B.A., Gay, R.E., Gay, S., and Jungel, A. (2014). Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 73, 1898-1904.
158. Huang, B.S., Luo, Q.Z., Han, Y., Li, X.B., Cao, L.J., and Wu, L.X. (2013). microRNA-223 promotes the growth and invasion of glioblastoma cells by targeting tumor suppressor PAX6. *Oncol Rep* 30, 2263-2269.
159. Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M.L., Nervi, C., and Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 123, 819-831.
160. Johnnidis, J.B., Harris, M.H., Wheeler, R.T., Stehling-Sun, S., Lam, M.H., Kirak, O., Brummelkamp, T.R., Fleming, M.D., and Camargo, F.D. (2008). Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 451, 1125-1129.
161. Ward, J.R., Heath, P.R., Catto, J.W., Whyte, M.K., Milo, M., and Renshaw, S.A. (2011). Regulation of neutrophil senescence by microRNAs. *PLoS One* 6, e15810.
162. Lu, T.X., Lim, E.J., Besse, J.A., Itskovich, S., Plassard, A.J., Fulkerson, P.C., Aronow, B.J., and Rothenberg, M.E. (2013). MiR-223 deficiency increases eosinophil progenitor proliferation. *J Immunol* 190, 1576-1582.
163. Li, T., Morgan, M.J., Choksi, S., Zhang, Y., Kim, Y.S., and Liu, Z.G. (2010). MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat Immunol* 11, 799-805.
164. Shi, L., Fisslthaler, B., Zippel, N., Fromel, T., Hu, J., Elgheznawy, A., Heide, H., Popp, R., and Fleming, I. (2013). MicroRNA-223 antagonizes angiogenesis by targeting beta1 integrin and preventing growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res* 113, 1320-1330.
165. Gong, B., Hu, H., Chen, J., Cao, S., Yu, J., Xue, J., Chen, F., Cai, Y., He, H., and Zhang, L. (2013). Caprin-1 is a novel microRNA-223 target for regulating

- the proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Biomed Pharmacother* 67, 629-636.
166. Grill, B., Wilson, G.M., Zhang, K.X., Wang, B., Doyonnas, R., Quadroni, M., and Schrader, J.W. (2004). Activation/division of lymphocytes results in increased levels of cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1: prototype of a new family of proteins. *J Immunol* 172, 2389-2400.
 167. El Gazzar, M., and McCall, C.E. (2012). MicroRNAs regulatory networks in myeloid lineage development and differentiation: regulators of the regulators. *Immunol Cell Biol* 90, 587-593.
 168. Fukao, T., Fukuda, Y., Kiga, K., Sharif, J., Hino, K., Enomoto, Y., Kawamura, A., Nakamura, K., Takeuchi, T., and Tanabe, M. (2007). An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell* 129, 617-631.
 169. Pulikkan, J.A., Dengler, V., Peramangalam, P.S., Peer Zada, A.A., Muller-Tidow, C., Bohlander, S.K., Tenen, D.G., and Behre, G. (2010). Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood* 115, 1768-1778.
 170. Mueller, B.U., and Pabst, T. (2006). C/EBPalpha and the pathophysiology of acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 13, 7-14.
 171. Mendler, J.H., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrozek, K., Becker, H., Metzeler, K.H., Schwind, S., Whitman, S.P., Khalife, J., Kohlschmidt, J., Nicolet, D., Powell, B.L., Carter, T.H., Wetzler, M., Moore, J.O., Kolitz, J.E., Baer, M.R., Carroll, A.J., Larson, R.A., Caligiuri, M.A., Marcucci, G., and Bloomfield, C.D. (2012). RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. *J Clin Oncol* 30, 3109-3118.
 172. Eyholzer, M., Schmid, S., Schardt, J.A., Haefliger, S., Mueller, B.U., and Pabst, T. (2010). Complexity of miR-223 regulation by CEBPA in human AML. *Leuk Res* 34, 672-676.
 173. Garbacki, N., Di Valentin, E., Huynh-Thu, V.A., Geurts, P., Irrthum, A., Crahay, C., Arnould, T., Deroanne, C., Piette, J., Cataldo, D., and Colige, A.

- (2011). MicroRNAs profiling in murine models of acute and chronic asthma: a relationship with mRNAs targets. *PLoS One* 6, e16509.
174. Dorhoi, A., Iannaccone, M., Farinacci, M., Fae, K.C., Schreiber, J., Moura-Alves, P., Nouailles, G., Mollenkopf, H.J., Oberbeck-Muller, D., Jorg, S., Heinemann, E., Hahnke, K., Lowe, D., Del Nonno, F., Goletti, D., Capparelli, R., and Kaufmann, S.H. (2013). MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J Clin Invest* 123, 4836-4848.
 175. Kuchenbauer, F., Mah, S.M., Heuser, M., McPherson, A., Ruschmann, J., Rouhi, A., Berg, T., Bullinger, L., Argiropoulos, B., Morin, R.D., Lai, D., Starczynowski, D.T., Karsan, A., Eaves, C.J., Watahiki, A., Wang, Y., Aparicio, S.A., Ganser, A., Krauter, J., Dohner, H., Dohner, K., Marra, M.A., Camargo, F.D., Palmqvist, L., Buske, C., and Humphries, R.K. (2011). Comprehensive analysis of mammalian miRNA* species and their role in myeloid cells. *Blood* 118, 3350-3358.
 176. Tili, E., Croce, C.M., and Michaille, J.J. (2009). miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer. *Int Rev Immunol* 28, 264-284.
 177. Allantaz, F., Cheng, D.T., Bergauer, T., Ravindran, P., Rossier, M.F., Ebeling, M., Badi, L., Reis, B., Bitter, H., D'Asaro, M., Chiappe, A., Sridhar, S., Pacheco, G.D., Burczynski, M.E., Hochstrasser, D., Vonderscher, J., and Matthes, T. (2012). Expression profiling of human immune cell subsets identifies miRNA-mRNA regulatory relationships correlated with cell type specific expression. *PLoS One* 7, e29979.
 178. O'Connell, R.M., Rao, D.S., Chaudhuri, A.A., Boldin, M.P., Taganov, K.D., Nicoll, J., Paquette, R.L., and Baltimore, D. (2008). Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* 205, 585-594.
 179. Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M.V., Couttet, P., Soond, D.R., van Dongen, S., Grocock, R.J., Das, P.P., Miska, E.A., Vetrie, D., Okkenhaug, K., Enright, A.J., Dougan, G., Turner, M., and Bradley, A. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316, 608-611.

180. Higgs, G., and Slack, F. (2013). The multiple roles of microRNA-155 in oncogenesis. *J Clin Bioinforma* 3, 17.
181. Ober, C., Cox, N.J., Abney, M., Di Rienzo, A., Lander, E.S., Changyaleket, B., Gidley, H., Kurtz, B., Lee, J., Nance, M., Pettersson, A., Prescott, J., Richardson, A., Schlenker, E., Summerhill, E., Willadsen, S., and Parry, R. (1998). Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. *Hum Mol Genet* 7, 1393-1398.
182. Long, L., Yu, P., Liu, Y., Wang, S., Li, R., Shi, J., Zhang, X., Li, Y., Sun, X., Zhou, B., Cui, L., and Li, Z. (2013). Upregulated microRNA-155 expression in peripheral blood mononuclear cells and fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* 2013, 296139.
183. Moore, C.S., Rao, V.T., Durafour, B.A., Bedell, B.J., Ludwin, S.K., Bar-Or, A., and Antel, J.P. (2013). miR-155 as a multiple sclerosis-relevant regulator of myeloid cell polarization. *Ann Neurol* 74, 709-720.
184. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., and Croce, C.M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15524-15529.
185. Aqeilan, R.I., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2010). miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ* 17, 215-220.
186. Yan, X., Liang, H., Deng, T., Zhu, K., Zhang, S., Wang, N., Jiang, X., Wang, X., Liu, R., Zen, K., Zhang, C.Y., Ba, Y., and Chen, X. (2013). The identification of novel targets of miR-16 and characterization of their biological functions in cancer cells. *Mol Cancer* 12, 92.
187. Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., and Croce, C.M. (2005). A

- MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353, 1793-1801.
188. Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., D'Urso, L., Pagliuca, A., Biffoni, M., Labbaye, C., Bartucci, M., Muto, G., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 14, 1271-1277.
 189. Bandi, N., Zbinden, S., Gugger, M., Arnold, M., Kocher, V., Hasan, L., Kappeler, A., Brunner, T., and Vassella, E. (2009). miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 69, 5553-5559.
 190. de Siqueira Figueredo, D., Gitai, D.L., and de Andrade, T.G. (2015). Daily variations in the expression of miR-16 and miR-181a in human leukocytes. *Blood Cells Mol Dis*.
 191. Gibbs, B.F., Papenfuss, K., and Falcone, F.H. (2008). A comparison of procedures for purifying human basophils to near homogeneity. *Inflamm Res* 57 Suppl 1, S11-12.
 192. Davoren, P.A., McNeill, R.E., Lowery, A.J., Kerin, M.J., and Miller, N. (2008). Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol* 9, 76.
 193. Gebhardt, T., Lorentz, A., Detmer, F., Trautwein, C., Bektas, H., Manns, M.P., and Bischoff, S.C. (2005). Growth, phenotype, and function of human intestinal mast cells are tightly regulated by transforming growth factor beta1. *Gut* 54, 928-934.
 194. Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiba-Takeuchi, K., Ina, J., Yano, M., Tsuchiya, A., Ueta, Y., Soma, A., Kanda, H., Matsumoto, M., and Kawaichi, M. (2004). HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development* 131, 1041-1053.
 195. Grau, S., Richards, P.J., Kerr, B., Hughes, C., Caterson, B., Williams, A.S., Junker, U., Jones, S.A., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2006). The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J Biol Chem* 281, 6124-6129.

196. Merkerova, M., Belickova, M., and Bruchova, H. (2008). Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol* 81, 304-310.
197. Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-86.
198. Wong, G.W., Foster, P.S., Yasuda, S., Qi, J.C., Mahalingam, S., Mellor, E.A., Katsoulotos, G., Li, L., Boyce, J.A., Krilis, S.A., and Stevens, R.L. (2002). Biochemical and functional characterization of human transmembrane tryptase (TMT)/tryptase gamma. TMT is an exocytosed mast cell protease that induces airway hyperresponsiveness in vivo via an interleukin-13/interleukin-4 receptor alpha/signal transducer and activator of transcription (STAT) 6-dependent pathway. *J Biol Chem* 277, 41906-41915.
199. Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricala, C., Amantea, A., Noonan, D.M., Albini, A., Natali, P.G., Lombardi, D., and Paggi, M.G. (2002). The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene* 21, 6684-6688.
200. Chien, J., Staub, J., Hu, S.I., Erickson-Johnson, M.R., Couch, F.J., Smith, D.I., Crawl, R.M., Kaufmann, S.H., and Shridhar, V. (2004). A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene* 23, 1636-1644.
201. Narkiewicz, J., Lapinska-Szumczyk, S., Zurawa-Janicka, D., Skorko-Glonek, J., Emerich, J., and Lipinska, B. (2009). Expression of human HtrA1, HtrA2, HtrA3 and TGF-beta1 genes in primary endometrial cancer. *Oncol Rep* 21, 1529-1537.
202. Zhu, F., Jin, L., Luo, T.P., Luo, G.H., Tan, Y., and Qin, X.H. (2010). Serine protease HtrA1 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 9, 508-512.
203. Franco, R., Collina, F., Di Bonito, M., Botti, G., Montanaro, D., Di Maio, L., Vincenzi, B., Landi, G., D'Aiuto, M., Caraglia, M., and Baldi, A. (2014). HtrA1 loss is related to aggressive behavior parameters in sentinel node positive breast cancer. *Histol Histopathol*.
204. Esposito, V., Campioni, M., De Luca, A., Spugnini, E.P., Baldi, F., Cassandro, R., Mancini, A., Vincenzi, B., Groeger, A., Caputi, M., and Baldi, A. (2006).

- Analysis of HtrA1 serine protease expression in human lung cancer. *Anticancer Res* 26, 3455-3459.
205. Onder, E., Arikok, A.T., Seckin, H., and Alper, M. (2015). Decrease in serine protease HtrA1 expression correlates with grade and recurrence in meningiomas. *Adv Med Sci* 60, 139-143.
 206. Yu, Y., Shao, W., Hu, Y., Zhang, J., Song, H., and Zhu, Z.H. (2012). HtrA1 expression associated with the occurrence and development of esophageal cancer. *World J Surg Oncol* 10, 179.
 207. Zurawa-Janicka, D., Kobiela, J., Galczyńska, N., Stefaniak, T., Lipińska, B., Lachinski, A., Skorko-Glonek, J., Narkiewicz, J., Proczko-Markuszczyńska, M., and Sledzinski, Z. (2012). Changes in expression of human serine protease HtrA1, HtrA2 and HtrA3 genes in benign and malignant thyroid tumors. *Oncol Rep* 28, 1838-1844.
 208. Lorenzi, T., Lorenzi, M., Altobelli, E., Marzoni, D., Mensa, E., Quaranta, A., Paolinelli, F., Morroni, M., Mazzucchelli, R., De Luca, A., Procopio, A.D., Baldi, A., Muzzonigro, G., Montironi, R., and Castellucci, M. (2013). HtrA1 in human urothelial bladder cancer: a secreted protein and a potential novel biomarker. *Int J Cancer* 133, 2650-2661.
 209. Baldi, A., Mottolese, M., Vincenzi, B., Campioni, M., Mellone, P., Di Marino, M., di Crescenzo, V.G., Visca, P., Menegozzo, S., Spugnini, E.P., Citro, G., Ceribelli, A., Mirri, A., Chien, J., Shridhar, V., Ehrmann, M., Santini, M., and Facciolo, F. (2008). The serine protease HtrA1 is a novel prognostic factor for human mesothelioma. *Pharmacogenomics* 9, 1069-1077.
 210. Catalano, V., Mellone, P., d'Avino, A., Shridhar, V., Staccioli, M.P., Graziano, F., Giordani, P., Rossi, D., Baldelli, A.M., Alessandroni, P., Santini, D., Lorenzon, L., Testa, E., D'Emidio, S., De Nictolis, M., Muretto, P., Fedeli, S.L., and Baldi, A. (2011). HtrA1, a potential predictor of response to cisplatin-based combination chemotherapy in gastric cancer. *Histopathology* 58, 669-678.
 211. Wachtfogel, Y.T., Abrams, W., Kucich, U., Weinbaum, G., Schapira, M., and Colman, R.W. (1988). Fibronectin degradation products containing the cytoadhesive tetrapeptide stimulate human neutrophil degranulation. *J Clin Invest* 81, 1310-1316.

212. Xie, D., Hui, F., and Homandberg, G.A. (1993). Fibronectin fragments alter matrix protein synthesis in cartilage tissue cultured in vitro. *Arch Biochem Biophys* 307, 110-118.
213. Polur, I., Lee, P.L., Servais, J.M., Xu, L., and Li, Y. (2010). Role of HTRA1, a serine protease, in the progression of articular cartilage degeneration. *Histol Histopathol* 25, 599-608.
214. Tsuchiya, A., Yano, M., Tocharus, J., Kojima, H., Fukumoto, M., Kawaichi, M., and Oka, C. (2005). Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone* 37, 323-336.
215. Graham, J.R., Chamberland, A., Lin, Q., Li, X.J., Dai, D., Zeng, W., Ryan, M.S., Rivera-Bermudez, M.A., Flannery, C.R., and Yang, Z. (2013). Serine protease HTRA1 antagonizes transforming growth factor-beta signaling by cleaving its receptors and loss of HTRA1 in vivo enhances bone formation. *PLoS One* 8, e74094.
216. Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M., Richards, P., Jones, S.A., Shridhar, V., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2005). Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6021-6026.
217. Murwantoko, Yano, M., Ueta, Y., Murasaki, A., Kanda, H., Oka, C., and Kawaichi, M. (2004). Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. *Biochem J* 381, 895-904.
218. Muratoglu, S.C., Belgrave, S., Hampton, B., Migliorini, M., Coksaygan, T., Chen, L., Mikhailenko, I., and Strickland, D.K. (2013). LRP1 protects the vasculature by regulating levels of connective tissue growth factor and HtrA1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 2137-2146.
219. Zhang, L., Lim, S.L., Du, H., Zhang, M., Kozak, I., Hannum, G., Wang, X., Ouyang, H., Hughes, G., Zhao, L., Zhu, X., Lee, C., Su, Z., Zhou, X., Shaw, R., Geum, D., Wei, X., Zhu, J., Ideker, T., Oka, C., Wang, N., Yang, Z., Shaw, P.X., and Zhang, K. (2012). High temperature requirement factor A1 (HTRA1) gene regulates angiogenesis through transforming growth factor-beta family member growth differentiation factor 6. *J Biol Chem* 287, 1520-1526.

220. Kang, H.K., Yoon, M.H., Lee, D.H., and Chin, H.S. (2012). Pharmacogenetic influence of LOC387715/HTRA1 on the efficacy of bevacizumab treatment for age-related macular degeneration in a Korean population. *Korean J Ophthalmol* 26, 414-422.
221. Chien, J., Aletti, G., Baldi, A., Catalano, V., Muretto, P., Keeney, G.L., Kalli, K.R., Staub, J., Ehrmann, M., Cliby, W.A., Lee, Y.K., Bible, K.C., Hartmann, L.C., Kaufmann, S.H., and Shridhar, V. (2006). Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 116, 1994-2004.
222. Clawson, G.A., Bui, V., Xin, P., Wang, N., and Pan, W. (2008). Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins. *J Cell Biochem* 105, 81-88.
223. De Luca, A., De Falco, M., Severino, A., Campioni, M., Santini, D., Baldi, F., Paggi, M.G., and Baldi, A. (2003). Distribution of the serine protease HtrA1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 51, 1279-1284.
224. De Luca, A., De Falco, M., De Luca, L., Penta, R., Shridhar, V., Baldi, F., Campioni, M., Paggi, M.G., and Baldi, A. (2004). Pattern of expression of HtrA1 during mouse development. *J Histochem Cytochem* 52, 1609-1617.
225. Jones, J.M., Datta, P., Srinivasula, S.M., Ji, W., Gupta, S., Zhang, Z., Davies, E., Hajnoczky, G., Saunders, T.L., Van Keuren, M.L., Fernandes-Alnemri, T., Meisler, M.H., and Alnemri, E.S. (2003). Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature* 425, 721-727.
226. Molnar, V., Ersek, B., Wiener, Z., Tombol, Z., Szabo, P.M., Igaz, P., and Falus, A. (2012). MicroRNA-132 targets HB-EGF upon IgE-mediated activation in murine and human mast cells. *Cell Mol Life Sci* 69, 793-808.
227. Radom-Aizik, S., Zaldivar, F., Jr., Oliver, S., Galassetti, P., and Cooper, D.M. (2010). Evidence for microRNA involvement in exercise-associated neutrophil gene expression changes. *J Appl Physiol* (1985) 109, 252-261.
228. Tserel, L., Runnel, T., Kisand, K., Pihlap, M., Bakhoff, L., Kolde, R., Peterson, H., Vilo, J., Peterson, P., and Rebane, A. (2011). MicroRNA expression profiles of human blood monocyte-derived dendritic cells and macrophages reveal miR-

- 511 as putative positive regulator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 286, 26487-26495.
229. Monticelli, S., Ansel, K.M., Xiao, C., Socci, N.D., Krichevsky, A.M., Thai, T.H., Rajewsky, N., Marks, D.S., Sander, C., Rajewsky, K., Rao, A., and Kosik, K.S. (2005). MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 6, R71.
 230. Tili, E., Michaille, J.J., Wernicke, D., Alder, H., Costinean, S., Volinia, S., and Croce, C.M. (2011). Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4908-4913.

11 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. Gilicze A, Köhalmi B, Pócza P, Keszei M, Jaeger J, Görbe E, Papp Z, Tóth S, Falus A, Wiener Z **HtrA1 is a novel mast cell serine protease of mice and men.** MOLECULAR IMMUNOLOGY 44:(11) pp. 2961-2968. (2007) IF: 3.742
2. Gilicze AB, Wiener Z, Toth S, Buzas E, Pallinger E, Falcone FH, Falus A **Myeloid-derived microRNAs, miR-223, miR27a, and miR-652, are dominant players in myeloid regulation.** BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL 2014: p. 870267. (2014) IF: 2.706*

Egyéb megjelent közlemények:

3. Falus A, Gilicze A **Tumor formation and antitumor immunity; the overlooked significance of histamine.** JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY 96:(2) pp. 225-231. (2014) IF: 4.304*

Megjegyzés: a *-gal jelölt Impakt Faktor-adatok az előző év alapján becsült értékeket jelenti.

12 KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Tóth Sárának** közös munkánk során biztosított szakmai és emberi támogatását.

Köszönöm TDK-s témavezetőmnek, **Dr. Wiener Zoltánnak**, hogy a tudományos munkával megismerttetett és hogy érdeklődésemet az értekezés témáját is megalapozó irányba terelgette.

Köszönöm **Prof. Falus Andrásnak** a Doktori Program vezetőjének és korábbi intézetvezetőnek a PhD tanulmányaim során nyújtott építő kritikáit, és munkámhoz szükséges tárgyi és személyi feltételek biztosítását.

Köszönöm **Prof. Buzás Editnek**, az Intézet jelenlegi vezetőjének, hogy doktori munkámat ötleteivel, biztatásával támogatta.

Szeretném megköszönni **PhD hallgató-társaimnak** a hasznos szakmai beszélgetéseket, és **az Intézet valamennyi dolgozójának** barátságos hozzáállásukat, értékes szakmai meglátásaikat és baráti szavaikat.

Szeretném köszönetemet nyilvánítani a **Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Centenárium Alapítvány** doktorjelölti ösztöndíjért.

Végül, de nem utolsósorban, szeretném megköszönni **családom és barátaim** támogatását, türelmét, szeretetét, amely nélkül doktori munkám lezárása nem valósulhatott volna meg.

13 ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra. A hízósejtek hatása más sejtekre kibocsátott citokinjeik, illetve kemokinjeik révén.	22
2. ábra. Bazofilok hatása más sejtekre kibocsátott citokinjeik, illetve kemokinjeik révén.	33
3. ábra. A miR-223 szabályozásában több autoregulátoros hurok vesz részt.....	37
4. ábra. A differenciálódó egér mukozális hízósejtjeiből származó sejtpreparátum festődése alciánkék-safraninnal.	50
5. ábra. IL-3, SCF, IL-9, TGF β I jelenlétében érett mukozális hízósejtek jönnek létre 20 napos sejt kultúrában, ahogy azt a csak IL-3 és SCF-tartalmú sejt kultúrában differenciáltatott éretlen kontroll sejtekhez viszonyítva láthatjuk.....	52
6. ábra. A HtrA1 a mukozális hízósejtek specifikus proteáza.	54
7. ábra. A HtrA1-re vonatkozó eredmények igazolása fehérjeszinten Western-blottal.	55
8. ábra. A humán triptáz típusú hízósejtek HtrA1-et expresszálnak.	56
9. ábra. A HtrA1 nem gátolja a TGF β I-indukált egér mukozális hízósejt differenciálódást.	58
10. ábra. Az izolált humán bazofil granulocita populáció tisztaságának igazolása.....	59
11. ábra. hIL-3 jelenlétében a humán bazofilok tenyésztésében kis sejtsomók alakulnak ki 100 perces kezelés során	60
12. ábra. A miR-155, a miR-223 és a miR-16 expressziója egészséges humán vöradókból származó humán bazofil granulocitákban.	61
13. ábra. A mieloid fejlődési irány mikroRNS általi szabályozottságának áttekintő vázlata.....	72

14 TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. táblázat. Míg a hisztamin-koncentráció (Student-féle t-teszt, $p < 0,001$) megnövekszik, a HtrA1-koncentráció szintje nem emelkedik meg az ionomycin-kezelt humán hízósejtekben	57
2. táblázat. A hIL-3 hatása a humán bazofilok mikroRNS-expressziójára	62
3. táblázat. A mieloid sejtek már publikált mikroRNS-ei.	69